

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:) Examiner: Unassigned
 TETSUYA YANO ET AL.) Group Art Unit: Unassigned
 Application No.: 09/430,029)
 Filed: October 29, 1999)
 DNA FRAGMENT CARRYING)
 TOLUENE MONOOXYGENASE)
 GENE, RECOMBINANT)
 PLASMID, TRANSFORMED)
 MICROORGANISM, METHOD)
 FOR DEGRADING)
 CHLORINATED ALIPHATIC)
 HYDROCARBON COMPOUNDS)
 AND AROMATIC COMPOUNDS,)
 AND METHOD FOR)
 ENVIRONMENTAL)
 REMEDIATION : December 17, 1999



Assistant Commissioner for Patents
 Washington, D.C. 20231

CLAIM TO PRIORITY

Sir:

Applicants hereby claims priority under the International Convention and all rights to which they are entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following Japanese Priority Application:

10-310801, filed October 30, 1998

A certified copy of the priority document is enclosed.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,

Rober Salton

 Attorney for Applicants
 Registration No. 21947

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
 30 Rockefeller Plaza
 New York, New York 10112-3801
 Facsimile: (212) 218-2200
 48615

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

CFO 13982 US / sub

#4

Priority
1-22-00



日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の図類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月30日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第310801号

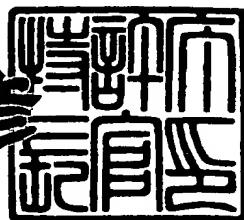
出願人
Applicant(s):

キヤノン株式会社

1999年11月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3080870

【書類名】 特許願

【整理番号】 3650013

【提出日】 平成10年10月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明の名称】 トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片、組換えプラスミド、形質転換微生物、該形質転換微生物を用いた揮発性有機塩素化合物および芳香族化合物の生物分解方法および環境修復方法

【請求項の数】 43

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 矢野 哲哉

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 今村 剛士

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

【氏名】 野本 肇

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100070219

【弁理士】

【氏名又は名称】 若林 忠

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100100893

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 勝

【選任した代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 輝之

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015129

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

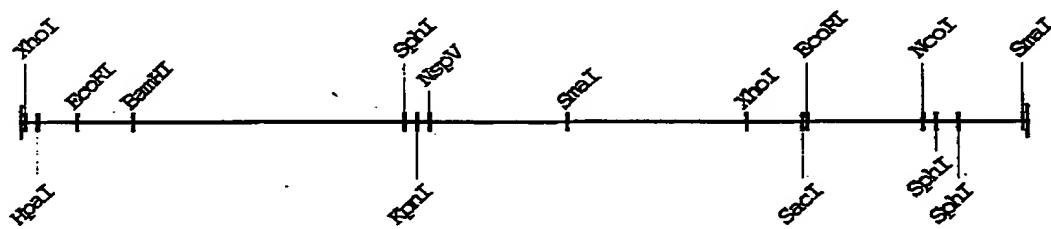
【書類名】 明細書

【発明の名称】 トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片、組換え
プラスマド、形質転換微生物、該形質転換微生物を用いた揮発性有機塩素化合物
および芳香族化合物の生物分解方法および環境修復方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.8KbのDNA断片であって、制限酵素の切断部位数がBamHI:1、EcoRI:2、HpaI:1、KpnI:1、NcoI:1、NspV:1、SacI:1、SmaI:2、SphI:3、XhoI:2、ClaI:0、DraI:0、EcoRV:0、HindIII:0、NdeI:0、NheI:0、PvuII:0、ScaI:0、Sse8387I:0、StuI:0、XbaI:0であり、以下に示す制限酵素地図：

【化1】



を有することを特徴とするDNA断片。

【請求項2】 配列表の配列番号：1に示すDNA配列を有する請求項1に記載のDNA断片。

【請求項3】 請求項1または2に記載のDNA断片と、宿主中の維持または複製を可能とするベクターとを結合した構成を有する組換えDNA。

【請求項4】 前記ベクターが、細菌中の維持または複製を可能とするものである請求項3に記載の組換えDNA。

【請求項5】 トルエンモノオキシゲナーゼをコードする部分を含むDNA断片であって、

配列表のTomLの有する配列番号：3のアミノ酸配列をコードする領域と、TomMの有する配列番号：4のアミノ酸配列をコードする領域と、TomNの有する配列番号：5のアミノ酸配列をコードする領域と、TomOの有する配列番号：6のアミノ

酸配列をコードする領域と、TomPの有する配列番号：7のアミノ酸配列をコードする領域と、を有し、

これらの領域が発現して、配列番号：3～7のアミノ酸配列を有するTomL～TomPがトルエンモノオキシゲナーゼ活性を有するポリペプチドを形成可能に配置されていることを特徴とするDNA断片。

【請求項6】 各領域間にスペーサー配列が存在しないか、あるいは各領域間の少なくとも1つにスペーサー配列が存在する請求項5に記載のDNA断片。

【請求項7】 TomQの有する配列表の配列番号：8のアミノ酸配列をコードする領域を更に含む請求項5または6に記載のDNA断片。

【請求項8】 請求項6または7に記載のDNA断片の有する各領域の少なくとも1つにおいて、トルエンモノオキシゲナーゼの活性が損なわれない範囲内の変異を生じさせて得られたことを特徴とするDNA断片。

【請求項9】 少なくともTomL～TomPからなるポリペプチドの有するトルエンモノオキシゲナーゼ活性を増強する性質を持つTomKの有する配列表の配列番号：2のアミノ酸配列または配列番号：2のアミノ酸配列をトルエンモノオキシゲナーゼ活性を増強する性質を損なわない範囲内で変異させた変異配列をコードする領域を含むことを特徴とするTomK用DNA断片。

【請求項10】 プロモーターと、請求項5～8のいずれかに記載のDNA断片と、ベクターとを有し、該プロモーターと、該DNA断片とが、該DNA断片にコードされるトルエンモノオキシゲナーゼが発現可能に結合していることを特徴とする組換えDNA。

【請求項11】 前記プロモーター及びベクターが、細菌中で機能し得るものである請求項9に記載の組換えDNA。

【請求項12】 第1のプロモーターと、該第1のプロモーターと、該第1のプロモーターにより発現可能に結合する請求項9に記載のTomK用DNA断片と、第2プロモーターと、該第2のプロモーターと、該第2のプロモーターにより発現可能に結合する請求項5～8のいずれかに記載のDNA断片と、ベクターとを有することを特徴とする組換えDNA。

【請求項13】 前記第1及び第2のプロモーター、並びに前記ベクターが

、細菌中で機能し得るものである請求項9に記載の組換えDNA。

【請求項14】 請求項3、4及び9～13のいずれかに記載の組換えDNAを宿主微生物に導入して得られたことを特徴とする形質転換体。

【請求項15】 宿主微生物が細菌である請求項14に記載の形質転換体。

【請求項16】 請求項14または15に記載の形質転換体に該形質転換体に導入した組換えDNAに基づく遺伝子産物であるトルエンモノオキシゲナーゼを生産させる工程を有することを特徴とするトルエンモノオキシゲナーゼの生産方法。

【請求項17】 請求項14または15に記載の形質転換体により揮発性有機塩素化合物および芳香族化合物の少なくとも一方を分解する工程を有することを特徴とする有機化合物の分解方法。

【請求項18】 挥発性有機塩素化合物または芳香族化合物が媒体の汚染物質であり、これらを分解することで媒体を浄化する請求項17に記載の分解方法。

【請求項19】 媒体が水性媒体である請求項18に記載の分解方法。

【請求項20】 媒体が土壤である請求項18に記載の分解方法。

【請求項21】 媒体が空気である請求項18に記載の分解方法。

【請求項22】 挥発性有機塩素化合物がトリクロロエリレン(TCE)及びジクロロエチレン(DCE)のいずれか一つである請求項17～21のいずれかに記載の分解方法。

【請求項23】 芳香族化合物がトルエン、ベンゼン、フェノール及びクレゾールのいずれか一つ以上である請求項17～22のいずれかに記載の分解方法。

【請求項24】 挥発性有機塩素化合物および芳香族化合物の少なくとも一方が汚染物質となって汚染された環境を、請求項14または15に記載の形質転換体により該汚染物質を分解することで修復することを特徴とする環境修復方法。

【請求項25】 環境が水性媒体により形成されている請求項24に記載の環境修復方法。

【請求項26】 形質転換体を担持させた担体に、環境を形成する水性媒体を接触させる請求項25に記載の環境修復方法。

【請求項27】 接触が形質転換体を担持させた担体を容器に収容し、その容器の一方から環境を環境を形成していた水性媒体を導入し、他方から修復処理された水性媒体を排出させる請求項26に記載の環境修復方法。

【請求項28】 環境が土壤により形成されている請求項24に記載の環境修復方法。

【請求項29】 形質転換体を含む水性媒体を汚染土壤中に導入し、栄養素および／あるいは酸素を付与する事により形質転換体を該土壤中で増殖させることにより行う請求項28に記載の環境修復方法。

【請求項30】 形質転換体の土壤中への導入は土壤に設けた注入井より圧力によって行う請求項29に記載の環境修復方法。

【請求項31】 形質転換体を含む液相中に汚染土壤を導入する請求項28に記載の環境修復方法。

【請求項32】 形質転換体を担持させた担体に、汚染土壤を接触させる請求項28に記載の環境修復方法。

【請求項33】 環境が空気により形成されている請求項24に記載の環境修復方法。

【請求項34】 形質転換体を含む液相中に汚染された空気を導入する請求項33に記載の環境修復方法。

【請求項35】 形質転換体を担持させた担体に、汚染された空気を接触させる請求項33に記載の環境修復方法。

【請求項36】 接触が形質転換体を担持させた担体を容器に収容し、その容器一方から汚染された空気を導入し、他方から浄化された空気を排出させる請求項35に記載の環境修復方法。

【請求項37】 挥発性有機塩素化合物がトリクロロエチレン（TCE）及びジクロロエチレン（DCE）の少なくとも一方である請求項24～36のいずれかに記載の環境修復方法。

【請求項38】 芳香族化合物がトルエン、ベンゼン、フェノール及びクレ

ゾールの少なくとも1つである請求項24～37のいずれかに記載の環境修復方法。

【請求項39】 配列表の配列番号：2～8のいずれか1つのアミノ酸配列を有することを特徴とするトルエンモノオキシゲナーゼを構成し得るコンポーネントポリペプチド。

【請求項40】 少なくとも配列表の配列番号：3～7のアミノ酸配列を有するコンポーネントポリペプチドTomL～TomPを有して構成されていることを特徴とするトルエンモノオキシゲナーゼ。

【請求項41】 配列表の配列番号：2のアミノ酸配列を有するコンポーネントポリペプチドTomKを更に有する請求項40に記載のトルエンモノオキシゲナーゼ。

【請求項42】 配列表の配列番号：8のアミノ酸を有するコンポーネントポリペプチドTomQを更に有する請求項40または41に記載のトルエンモノオキシゲナーゼ。

【請求項43】 請求項40～42に記載のトルエンモノキシゲナーゼを、その酵素活性を損なわない範囲内で、変異させた変異トルエンモノオキシゲナーゼ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含む新規なDNA断片、このDNA断片を含む新規な組換えDNA、この組換えDNAを保持する形質転換体、およびこの形質転換体を用いたトリクロロエチレン(TCE)やジクロロエチレン(DCE)のような揮発性有機塩素化合物およびトルエン、ベンゼン、フェノール、クレゾールのような芳香族化合物の生分解処理方法、特に揮発性有機塩素化合物あるいは芳香族化合物を含む排水や廃液等の水性媒体の浄化、それによって汚染された土壤の修復、および揮発性有機塩素化合物によって汚染された空気(気相)の浄化に有用な環境修復方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、生体に対し有害かつ難分解性である揮発性有機塩素化合物による環境汚染が大きな問題となってきている。特に、国内外の工業地域の土壤中にはテトラクロロエチレン（PCE）やトリクロロエチレン（TCE）、ジクロロエチレン（DCE）等の揮発性有機塩素化合物による汚染がかなりの範囲で拡がっていると考えられており、実際に環境調査等で検出された事例が多数報告されている。これらの揮発性有機塩素化合物は土壤中に残留したものが雨水等により地下水中に溶解して周辺地域一帯に拡がるとされている。これらの化合物には発癌性の疑いがあり、また環境中で安定であるため、特に飲料水の水源として利用されている地下水の汚染は深刻な社会問題となっている。

【0003】

このようなことから、揮発性有機塩素化合物の除去、分解による、汚染地下水等の水性媒体、土壤、およびそれに伴う周辺気相の浄化は、環境保全の視点からきわめて重要な課題であり、浄化に必要な技術の開発（例えば、活性炭による吸着処理、光や熱による分解処理等）が行われてきていますの、現状の技術はコストや操作性の面からかならずしも実用的であるとはいえない。一方、環境中で安定であるTCE等の揮発性有機塩素化合物に対して近年微生物による分解が報告され、その利点として、1) 微生物を用いた生物分解処理では用いる微生物を選択することで無害な物質までに揮発性有機塩素化合物を分解できること、2) 基本的に特別な薬品が不要であること、3) メンテナンスにかかる労力やコストを軽減できること、等が挙げられている。

【0004】

例えば、TCE分解菌としては、*Welchia alkenophila* sero 5 (USP 487736, ATCC 53570)、*Welchia alkenophila* sero 33 (USP 487736, ATCC 53571)、*Methylocystis* sp. Strain M (Agric. Biol. Chem., 53, 2903 (1989)、Biosci. Biotech. Bichem., 56, 486 (1992)、同56, 736 (1992))、*Methylosinus trichosporium* OB3b (Am. Chem. Soc. Natl. meet. Dev. Environ. Microbiol., 29, 365 (1989)、Appl. Environ. Microbiol., 55, 3155 (1989)、Appl. Biochem. Biotechnol., 28, 877 (1991)、特開平02-92274号公報、特開平03-292970号報)、*Methylomo*

nas sp. MM2 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 236 (1991))、*Alcaligenes denitrificans* ssp. *Xylosoxidans* JE75 (*Arch. Microbiol.*, 154, 410 (1990))、*Alcaligenes eutrophus* JMP134 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1179 (1990))、*Alcaligenes eutrophus* FERM-13761 (特開平07-123976号公報)、*Pseudomonas aeruginosa* JI104 (特開平07-236895号公報)、*Mycobacterium vaccae* J0 B5 (*J. Gen. Microbiol.*, 82, 163 (1974)、*Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2960 (1989)、ATCC 29678)、*Pseudomonas putida* BH (下水道協会誌, 24, 27 (1987))、*Pseudomonas* sp. strain G4 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 383 (1968)、同53, 949 (1987)、同54, 951 (1989)、同56, 279 (1990)、同57, 193 (1991)、USP 4925802、ATCC 53617、この菌は初め*Pseudomonas cepacia*と分類されていたが、*Pseudomonas* sp.に変更された)、*Pseudomonas mendocina* KR-1 (*Bio/Technol.*, 7, 282 (1989))、*Pseudomonas putida* F1 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1703 (1988)、同54, 2578(1988))、*Pseudomonas fluorescens* PFL12 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2578 (1988))、*Pseudomonas putida* KWI-9(特開平06-70753号公報)、*Pseudomonas cepacia* KK01 (特開平06-227769号公報)、*Nitrosomonas europaea* (*Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1169 (1990))、*Lactobacillus vaginalis* sp. nov (*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 368 (1989)、ATCC 49540)、*Nocardia corallina* B-276 (特開平08-70881号公報、FERM BP-5124、ATCC 31338)などが報告されている。

【0005】

しかしながら、これらの分解菌を実際の環境浄化処理に用いる場合に問題となるのが、TCE等の揮発性有機塩素化合物の分解活性の発現最適化および継続性である。フェノール、トルエン、メタンなどを誘導物質として利用した環境浄化処理においては、これらの誘導物質の枯渇がそのままTCE等の揮発性有機塩素化合物の分解停止をもたらすために、継続的な誘導物質の供給が不可欠である。しかしながらその一方で、誘導物質が存在する場合には分解浄化の目的物質であるTCE等の揮発性有機塩素化合物の基質親和性が誘導物質のそれに比較しかなり低いため、効率の良い分解浄化が困難となる場合があるといった相反する課題も抱えている。さらに、実際の処理現場においては誘導物質濃度の緻密な制御は

望むべくもなく、浄化処理の安定性、再現性について本質的な課題を抱えている。また添加した誘導物質が環境中に流出してしまう危険性も指摘されている。例えば、フェノールやトルエンといった芳香族化合物はきわめて有効な誘導物質であるが、その毒性が高いことから環境中への放出はその影響がないような限定された条件下でしか行うことができない。また、メタンも有効な誘導物質であるが、可燃性の気体であり、環境中に導入して制御することは多大な危険と困難を伴う。

【0006】

このように分解微生物を利用した実際の環境浄化においては、誘導物質を利用しての分解活性の継続的な発現と分解浄化の効率の上昇は相容れない困難な課題であり、また環境浄化のために新たな環境汚染を招く危険性もあり、微生物を利用した環境浄化処理の実用化の大きな課題となっている。

【0007】

このような課題を解決するために、ネルソンらは揮発性有機塩素化合物の分解誘導物質としてトリプトファンを用いる方法を開発した（特開平4-502277号公報）。しかしながらトリプトファンは高価な物質であり、その誘導物質固有の問題である毒性および危険性に関しては回避可能であるものの、環境中に過剰の炭素源および窒素源を添加すること自体が環境の富栄養化を招く点で好ましくない。また、TCE分解においてトリプトファンが拮抗阻害剤となる点については、何ら解決策になっていない。

【0008】

ここでシールズらは、誘導物質（この場合フェノールあるいはトルエン）を必要とせずTCE分解能を有するシュードモナス・セバシア（ATCCへの寄託上はシュードモナス・スピーシズに変更）G4株の変異株を、トランスポゾンを用いた手法で取得している（Appl. Environ. Microbiol., 58, 3977 (1992)、国際公開W092/19738号）。またメタン資化性のTCE分解菌であるメチロシナス・トリコスポリウムOB3b株でも、誘導物質であるメタンを必要としないTCE分解変異株を取得したと報告されている（米国特許第5316940号）。

【0009】

さらには、特開平8-294387号公報において、ニトロソグアニジンによって変異操作を行い、誘導物質を必要とせず揮発性有機塩素化合物および芳香族化合物を分解しうる菌株JM1株 (FERM BP-5352) が報告されている。一方で、前培養時に誘導物質を利用してTCE分解能を発現させ、それを休止菌体として修復現場に投与する試みも検討されてきている (Environ. Sci. Technol., 30, 1982 (1996))。

【0010】

実際にこれらの誘導物質を不要とした浄化処理においては、前述の誘導物質を用いる場合に比較すれば浄化処理の制御が容易となり、また浄化効率についても上昇が報告されている。

【0011】

しかしながら、必要に応じた分解活性の発現および分解の継続については分解菌の増殖制御が大きな課題となっており、また休止菌体を利用する場合には、そもそも投入した休止菌体が分解しうるTCE分解量あるいは分解継続時間のキャパシティーを超えてのTCE分解は不可能である点、さらに大規模スケールの場合においては、休止菌体化の処理自体に時間を要することから活性の低下を免れない点、処理装置が大規模なものとなり、処理が煩雑かつコスト的に不利な点が課題となっている。そこで現在、TCE分解酵素であるオキシゲナーゼあるいはハイドロキシラーゼをコードする遺伝子領域を含むDNA断片を組み込んだプラスミドを宿主微生物に導入し、無害な誘導物質により、あるいは誘導物質が存在しない状況でも構成的にTCE分解活性を発現させようとする試みがなされている。例えば、シードモナス・メンドシナ KR-1 (特開平2-503866号公報)、シードモナス・プチダ KWI-9 (特開平6-105691号公報)、シードモナス・プチダ、BH (地下水・土壤汚染とその防止対策に関する研究集会 第3回講演集, 213 (1994))、シードモナス・プチダF1由来のトルエン分解酵素遺伝子とシードモナス・シードアルカリゲネス由来のビフェニル分解酵素遺伝子のハイブリッド遺伝子を保持する形質転換体 (特開平7-143882) などが挙げられる。しかしながら、これらの報告にある形質転換体でのTCE分解能ははなはだ低く、組換え体であることによる分解制御の容易さ、組換え体設計の自由度、誘導物質が

不要であるなどの利点が活かされておらず、効率の良いTCE分解は達成されていなかった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、芳香族化合物および／あるいは有機塩素化合物分解能が高い新規なトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片、このDNA断片を含む新規な組換えDNA、この組換えDNAを保持する形質転換体を提供し、また、この形質転換体を用いたトリクロロエチレン（TCE）やジクロロエチレン（DCE）のような揮発性有機塩素化合物およびトルモン、ベンゼン、フェノール、クレゾールのような芳香族化合物の効果的な生物分解処理法、特に揮発性有機塩素化合物あるいは芳香族化合物を含む排水や廃液等の水性媒体の浄化、それによって汚染された土壌の修復、および揮発性有機塩素化合物によって汚染された空気（気相）の浄化に有用な効率の良い環境修復方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

上記の目的は以下の本発明によって達成される。発明者らは、トルエンを酸化してオルトクレゾール、3-メチルカテコールを生成する機能を有するトルエンモノオキシゲナーゼを保有する微生物バルクホルデリア・セパシア（*Burkholderia cepacia*）KK01株（旧名*Pseudomonas cepacia*であり、通産省生命工学工業技術研究所にブタペスト条約に基づいて寄託されている。受託日：平成4年3月11日、受託番号：FERM BP-4235）から、該酵素をコードする遺伝子を単離すべく鋭意努力した結果、トルエンモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子の単離に成功し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明はトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.8kbのDNA断片であって、図1に示す制限酵素地図を有することを特徴とするDNA断片、該DNA断片の全部あるいは一部を含む組換えプラスミド、および該プラスミドにより形質転換されたトルエンモノオキシゲナーゼを産生する形質転換微生物を提供するものであり、更に該形質転換微生物による環境修復方法を提供するものである。また、本発明により

トルエンモノオキシゲナーゼをコードするDNA断片、トルエンモノオキシゲナーゼ及びそれを構成するコンポーネントポリピチドが提供される。

【0014】

本発明におけるトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片は、バルクホルデリア・セパシアKK01株（以下KK01株という）から分離される。ここでKK01株の菌学的諸性質および培養方法については特開平06-22769号に記載されている。

【0015】

本発明におけるこのDNA断片の分離は、KK01株の全DNAを制限酵素Sau3AIで部分分解することにより得られる。具体的には、上記微生物を適当な培地、例えばLB培地（1リットル中にトリプトン10g／酵母エキス5g／塩化ナトリウム5gを含む）などで培養し、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）存在下で70℃処理を行うなどの菌体破碎処理を行って常法により全DNAを調製し、制限酵素Sau3AIの部分分解によりトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.8kbのDNA断片を得ることができる。このようにして得たDNA断片を、BamHIで完全分解したプラスミドベクター、例えばpUC18とライゲーションしハナハンの方法によりコンピテントセルとした大腸菌JM109などに該組換えベクターを導入し、形質転換体を得、その後に適当な選択手段、例えばアンピシリンを含むLB培地プレートで培養することにより形質転換株を選択することができる。

【0016】

上記形質転換株から、トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含む組換えベクターを有する形質転換株を選択するには、形質転換株選択用のLB培地にあらかじめクレゾール、フェノールなどを含有させておくと良い。トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含む形質転換株は、トルエンモノオキシゲナーゼが各基質をモノオキシゲネーションすることにより生成するメチルカテコール、あるいはカテコールが自動酸化することにより、褐色のコロニーとして選択が可能である。また、通常のLB培地プレートで培養後、各基質を散布し、同様に褐色コロニーを選択しても良い。

【0017】

本発明における単離された 5. 8 kb の約DNA断片は、以下の制限酵素に対して、次の切断部位及び切断部位数を有する。

制限酵素 切断部位数

| | |
|-------|---|
| BamHI | 1 |
| EcoRI | 2 |
| HpaI | 1 |
| KpnI | 1 |
| NcoI | 1 |
| NspV | 1 |
| SacI | 1 |
| SmaI | 2 |
| SphI | 3 |
| XbaI | 2 |

なお、*Cla*I、*Dra*I、*Eco*RV、*Hind*III、*Nde*I、*Nhe*I、*Pvu*II、*Sca*I、*Sse*8387I、*S**tu*I、*Xba*I の各制限酵素の切断部位については該DNA断片中には存在しなかった。

【0018】

本発明におけるDNA断片の制限酵素地図は上記の通りであり、ここでトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子としては、バルクホルデリア・セパシアG4 5223 PR1 (*Burkholderia cepacia* G4 5223 PR1) 由来のもの (米国特許第5543317号)、バルクホルデリア・スピーシズ JS150 (*Burkholderia* sp. JS150) 由来のもの (Appl. Environ. Microbiol., 61, 3336 (1995))、シュードモナス・ピケッティ PK01 (*Pseudomonas pickettii* PK01) 由来のもの (J. Bacteriol., 176, 3749 (1994))、シュードモナス・メンドシナ KR1 (*Pseudomonas mendocina* KR1) 由来のもの (J. Bacteriol., 173, 3010 (1991)) が報告されており、また、類似の構造を有すると報告されているフェノールハイドロキシラーザについては、アシネットバクター・カルコアセティカス NCIB8250 (*Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250) 由来のもの (Mol. Microbiol., 18, 13 (1995))、シュードモナス・スピーシズ CF600 (*Pseudomonas* sp. CF600) 由来のもの (J. Bacteriol., 172, 68

26 (1990)), シュードモナス・サブスピーシズ(*Pseudomonas spp.*)由来のもの (J. Bacteriol., 177, 1485 (1995)), シュードモナス・プチダ P35X (*Pseudomonas putida* P35X) 由来のもの (Gene, 151, 29 (1994)) が報告されているが、本発明におけるDNA断片はいずれのものとも異なる制限酵素地図を有するものであり、本発明におけるDNA断片が全く新規なトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子をコードしていることは明らかである。

【0019】

このようにして得られたDNA断片はpUC18に組み換えたままでも十分な芳香族化合物および／あるいは有機塩素化合物分解能を有するが、分解能のさらなる向上あるいは処理現場への最適化のために、発現ベクター、あるいは広宿主域ベクターなどに適宜組換えて用いることもできる。

【0020】

本発明における組換えプラスミドは、例えば以下の構成要素を有するDNA断片により構成できる。

【0021】

- 1) トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子
- 2) マーカー遺伝子（薬剤耐性あるいは栄養要求性相補など）
- 3) 自律複製配列を含むベクター（プラスミド等）

トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子としては、上記のような約5. 8 kbの断片をそのまま用いててもよいし、トルエンモノオキシゲナーゼ活性に必要なコンポーネントが発現するような構成のものを用いることができる。例えば、スペーサー配列を含まない形態として、あるいはスペーサー配列を含む形態としてもよい。更に、各コンポーネントは、その機能を損なわない範囲で変異したものでもよく、この変異は、これらをコードするDNA配列を変異させることで得ることができる。

【0022】

薬剤耐性遺伝子としては、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン (G 4 1 8、ネオマイシン) 耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などを用いることができる。栄養

要求性の相補には、宿主として選択した微生物が要求する栄養素を補完するような遺伝子配列を用いることができ、例えばアミノ酸要求性に対してその欠損部分を相補する遺伝子を供するのが一般的である。

【0023】

自律複製配列としては、グラム陰性菌の多くで広宿主域複製領域として機能するプラスミドRSF1010由来の配列などを用いることができる。また、不和合性グループであるIncP、IncQあるいはIncWのいずれにも属さない他の広宿主域複製領域を含むベクターpBBR122(Mo Bi Tec)などを利用することも可能である。

【0024】

本発明における組換えプラスミドには、種々のプロモータやターミネータを用いることができ、更に、芳香族化合物および/あるいは有機塩素化合物分解能の向上、制御方法のための種々の要素を導入することもできる。具体的には、プロモーターとしては、lac、trc、tac、T3、T7などの各プロモータが利用可能である。また、ターミネータとしてはrrnBオペロンターミネータなどを用いることができる。また、発現の制御には、lacIqなどのリプレッサー遺伝子とlacオペレータの導入により、イソプロピルチオガラクトシド(IPTG)などの誘導物質による制御が可能となる。また、これらのリプレッサー・オペレータを構成要素として加えないことにより、構成的な分解活性発現も可能である。その他温度感受性の制御系なども用いることができる。

【0025】

これらの構成要素を含む発現ベクターなどへのトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子DNA断片の組換えには、既存の制限酵素切断部位をそのまま用いてもよいし、部位特異的突然変異、あるいは塩基置換を含むプライマを用いたPCR(ポリメラーゼチャインリアクション)などによって新たに創出した制限酵素切断部位を用いてもよい。一般には発現ベクターへの組換えは制限酵素NcoI切断部位を用いることが多く、部位特異的突然変異あるいはプライマの設計に際してはインシエーションコドンであるATGあるいはGTG領域にNcoI切断部位を創出できるよう設計すると便利である。またアダプタなどを用いた公知の方法によってもよい。発現の最適化のために、エクソヌクレアーゼIIIあるいはBa131ヌクレアーゼ

などで該DNA断片を適宜欠失させることも可能である。このように、発現ベクターへの組換えに際しては目的に適った分子生物学的手法を適用すればよい。

【0026】

宿主微生物への所望の遺伝子を含む組換えプラスミドの導入方法としては、外来遺伝子を宿主に導入できる方法ならばいかなる方法を用いてもよいが、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポーレーション法、接合伝達法など公知の方法を利用できる。

【0027】

本発明に用いる宿主微生物としては、組換えプラスミドで導入した芳香族化合物および／あるいは有機塩素化合物の分解活性を効果的に発現し得る微生物であればいかなるものでもよく、具体的にはエシェリチア(*Escherichia*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、バルクホルデリア(*Burkholderia*)属、アシネトバクター(*Acinetobacter*)属、モラセラ(*Moraxella*)属、アルカリゲネス(*Alcaligenes*)属、ビブリオ(*Vibrio*)属、ノカルジア(*Nocardia*)属、バチルス(*Bacillus*)属、ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属、アクロモバクター(*Achromobacter*)属、アルスロバクター(*Arthrobacter*)属、ミクロコッカス(*Micrococcus*)属、マイコバクテリウム(*Mycobacterium*)属、メチロシナス(*Methylosinus*)属、メチルモナス(*Methylomonas*)属、ベルキア(*Welchia*)属、メチロシスチス(*Methylocystis*)属、ニトロゾモナス(*Nitrosomonas*)属、サッカロミセス(*Saccharomyces*)属、カンジダ(*Candida*)属、トルロプシス(*Torulopsis*)属、に属する微生物などが挙げられる。

【0028】

さらには、J1株、JM1株、シュードモナス・スピーシズ(*Pseudomonas* sp.) TL1株、KKO1株、シュードモナス・アルカリゲネス(*Pseudomonas alc aligenes*) KB2株、アルカリゲネス・スピーシズ(*Alcaligenes* sp.) TL2株、ビブリオ・スピージズ(*Vibrio* sp.) KB1株などの芳香族化合物および／あるいは有機塩素化合物分解菌なども宿主として供することができる。なお、これらの菌株は通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されおり、KKO1株以外の受託日及び受託番号は以下のとおりである。なお、BP番号のものは

ブタペスト条約下での寄託である。

J 1 株

(受託日：平成6年5月25日、受託番号：FERM BP-5102)

J M 1 株

(受託日：平成7年1月10日、受託番号：FERM BP-5352)

T L 1 株

(受託日：平成7年1月10日、受託番号：FERM P-14726)

T L 2 株

(受託日：平成6年11月15日、受託番号：FERM P-14642)

K B 1 株

(受託日：平成6年11月15日、受託番号：FERM P-14643)

K B 2 株

(受託日：平成6年11月15日、受託番号：FERM BP-5354)

なお、J 1 及び JM 1 株は、当初コリネバクテリウム・スピーシス (*Corynebacterium sp.*) として分類されたので、かかる分類に基づいて寄託されたが、その後、コリネバクテリウム属に属さない、と認められたため、これらの寄託における識別の表示から属名を削除し、単に、「J 1」及び「JM 1」とした。JM 1 株は、J 1 株から変異原を用いた変異操作によって変異させて取得したもので、誘導物質を用いることなく有機化合物を分解することができる変異株である。

【0029】

さらに、これらの組換え微生物の分解能力をより有效地に使うためには、処理を施す環境から取得した微生物、さらには該環境においてドミナントである微生物を宿主とした組換え体は、環境適応を考慮すると望ましい。一般に自然界においては、既に環境にある微生物が一番その環境に適合しており、外部から導入した微生物がその環境に適合し生残する可能性は一般にはあまり高くない。また、逆に外部から導入する微生物が極めて強い微生物であったりした場合も、既に存在している生態系を攪乱したりしてしまう危険性がある。この点で、既にそこに存在する微生物を宿主として用いるのは先にも述べたように、環境に対する親和性、生残性、安全性の面からより優れた方法であるといえる。

【0030】

組換えプラスミドを導入した形質転換体の培養は、宿主の生育に適した条件で行えばよく、例えば炭素源、窒素源として酵母エキス、トリプトン、ペプトンなど、無機塩として塩化ナトリウム、塩化カリウム、などを用いることができる。またM9培地（1リットル中に Na_2HPO_4 ：6.2g、 KH_2PO_4 ：3.0g、 NaCl ：0.5g、 NH_4Cl ：1.0gを含む）に、各種ミネラルおよび適當な炭素源、例えばリンゴ酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどを加えたものを用いることもできる。さらに酵母エキス、トリプトン、ペプトンなどを組み合わせて用いてもよい。培地のpH、培養温度は宿主微生物に好適なものとすればよいが、一般的にはpH5～9程度、培養温度は15～37℃が好適である。

【0031】

トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含む組換えDNAで形質転換して得られた形質転換体は、媒体中に含まれる揮発性有機塩素化合物や芳香族化合物の分解処理に好適に用い得る。すなわち、本発明における芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物の分解処理は、水性媒体中、土壤中、および気相中の芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物とこの形質転換体を接触させることによって行うことができる。分解微生物と芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物の接触は、微生物が分解活性を発現し得る条件であればいかなる方法でも行うことができ、バッチ法、半連続法、連続法など種々の方法を用いて実施できる。該微生物は半固定状態あるいは適当な担体に固定化して用いることもできる。汚染水、排水、廃液、土壤、気相などの被処理物は、必要に応じて各種処理を行ってもよい。以下、この処理方法について更に説明する。

【0032】

本発明における水性媒体中の芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物の分解処理は、水性媒体中に存在する芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物と分解微生物を接触させることによって行うことができる。以下に主な利用形態を述べるが、これらの形態に限定されることなく、いかなる水性

媒体中の芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物汚染の浄化処理にも利用可能である。

【0033】

例えば、最も簡便な方法としては、芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物によって汚染された水性媒体中に直接分解微生物を導入してやるという方法がある。この場合、水性媒体のpH、塩濃度、温度や汚染物質の濃度などを分解微生物の種類によって最適なものとしてやればよい。

【0034】

また別の利用形態としては、培養槽を設け分解微生物を培養し、この培養槽に芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物で汚染された水性媒体を所定の流量で導入し、分解させる形態がある。水性媒体の導入および排水は連続して行ってもよいが、処理能力に応じて間欠的に、あるいはバッチ式で処理することも可能である。このような制御を芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物の濃度に合わせてシステム制御し最適化を図るとよい。

【0035】

さらに、分解微生物を担体、例えば土壤粒子などに付着させ、これを反応槽に充填し、この反応槽内に芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物汚染水性媒体を導入し分解処理を行う形態がある。この場合使用する担体は、土壤粒子に限らずいかなるものでも利用可能であるが、微生物の保持能力に優れ、通気性を損なわないようなものがより望ましい。例えば、微生物の棲息空間を与えるような材料として、従来より医薬品工業、食品工業、廃水処理システムなどで利用されるバイオリアクタにおいて汎用される様々な微生物担体が利用できる。より具体的には、多孔質ガラス、セラミクス、金属酸化物、活性炭、カオリナイト、ペントナイト、ゼオライト、シリカゲル、アルミナ、アンスラサイトなどの無機粒子状担体、デンプン、寒天、キチン、キトサン、ポリビニルアルコール、アルギン酸、ポリアクリルアミド、カラギーナン、アガロース、ゼラチンなどのゲル状担体、イオン交換性セルロース、イオン交換樹脂、セルロース誘導体、グルタルアルデヒド、ポリアクリル酸、ポリウレタン、ポリエステルなどが挙げられる。また、天然物として、綿、麻、紙類といったセルロース系のもの、木粉、

樹皮といったリグニング系のものも利用可能である。

【0036】

本発明における土壤中の芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物の分解処理は、土壤中に存在する芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物と分解微生物を接触させることによって行うことができる。以下に主な利用形態を述べるが、これらの形態に限定されることなく、本方法はいかなる土壤中の芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物汚染の浄化処理にも利用可能である。

【0037】

例えば、最も簡便な方法としては、芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物によって汚染された土壤中に直接分解微生物を導入してやるという方法がある。導入の方法としては、土壤表面に散布してやる方法はもとより、比較的深い地層中の処理の場合には、地中に挿入した井戸より導入してやる方法がある。さらに、空気や水などによって圧力をかけてやる広範囲に分解微生物が拡がり、より効果的である。この場合、土壤中の諸条件を分解微生物に適するように制御すればよい。

【0038】

さらに、分解微生物を担体付着させ、これを反応槽に充填し、この反応槽を芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物で汚染された土壤の、主に帶水層中に導入し分解処理を行う形態がある。反応槽の形態はフェンス状やフィルム状のような、土壤中の広範囲を網羅できるものが望ましい。この場合、使用する担体はいかなるものでも利用可能であるが、微生物の保持能力に優れ、通気性を損なわないようなものがより望ましい。例えば、先に例示した微生物の棲息空間を与えるような材料として、従来より医薬品工業、食品工業、廃水処理システムなどで利用されているバイオリアクタにおいて汎用される様々な微生物担体が利用できる。

【0039】

本発明における気相中の芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物の分解処理は、気相中に存在する芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素

化合物と分解微生物を接触させることによって行うことができる。以下に主な利用形態を述べるが、これらの形態に限定されることなく、本方法はいかなる気相中の芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物気相汚染の浄化処理にも利用可能である。

【0040】

例えば、培養槽を設け分解微生物を培養し、この培養槽に芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物で汚染された気体を所定の流量で導入し、分解させる形態にある。気体の導入法についてはなんら制限はないが、気体の導入により培養液が攪拌されエアレーションが促進される形態がより望ましい。気体の導入および排気は連続して行ってもよいが、処理能力に応じて間欠的に、あるいはバッチ式で処理することも可能である。このような制御を揮発性有機塩化合物の濃度に合わせてシステム制御し最適化を図るとよい。

【0041】

また、別の利用形態としては分解微生物を担体、例えば土壤粒子などに付着させ、これを反応槽に充填し、この反応槽内に芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物汚染気体を導入し分解処理を行う形態がある。この場合、使用する担体は土壤粒子に限らずいかなるものでも利用可能であるが、微生物の保持能力に優れ、通気性を損なわないようなものがより望ましい。例えば、先に例示した微生物の棲息空間を与えるような材料として、従来より医薬品工業、食品工業、廃水処理システムなどで利用されているバイオリアクタにおいて汎用される様々な微生物担体が利用できる。

【0042】

さらに、分解微生物の保持と栄養供給を兼用できる材料としては、農林水産業関係で利用される堆肥などにその例を多く挙げることができる。すなわち、麦わらなどの穀物類の藁や大鋸屑、米糠、雪花菜、砂糖黍の絞りかすなどの植物由来の乾燥物、またはカニやエビの殻などの海産廃棄物などが利用できる。

【0043】

汚染気体の浄化は、担体になる物質をあらかじめ充填した上で分解微生物を導入すればよい。分解反応をより効率的に行わせるためには、さきに述べた栄養素

、含水比、酸素濃度などを所望の条件に保つとよい。また、反応槽内の担体と水分量の比は分解微生物の生育と通気性から、反応槽の形態は処理する気体の量、濃度などにより適宜選択すればよいが、気体と担体に保持される分解微生物との接触が促進されるように配慮するとよく、例えば、カラム、チューブ、タンク、箱形のものを利用することができる。さらにこのような形状のものを排気ダクトやフィルタなどとユニット化してもよいし、能力に合わせていくつかを連続させてもよい。

【0044】

汚染気体は、初め担体材料に吸着する場合もあり、微生物利用の効果がうまく観察されない例も稀にあるが、一定期間の後には担体材料に付着した汚染物質が分解され、また汚染物質の分解した材料表面に再度汚染物質が吸着し、担体材料への吸着性が再生されるといわれている。このようにして、汚染除去能は飽和することなく常に一定の分解が期待できる。

【0045】

本発明の方法は、閉鎖系、開放系いずれの廃液処理、土壤処理、および空気処理方法にも適用できる。なお、微生物を担体などに固定して用いたり、生育を促進する各種の方法を併用してもよい。

【0046】

【実施例】

以下に本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

＜実施例1＞

(KK01株のトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子のクローニング)

トルエン資化能を有するKK01株を100mlのLB培地(1リットル中にトリプトン10g／酵母エキス5g／塩化ナトリウム5gを含む)で一晩培養した後に集菌し、100mMリン酸緩衝液(pH8.0)で洗浄した。得られた菌体に10mlのSTE(10mMトリス(pH8.0)／1mM EDTA／100mM塩化ナトリウム)と10%のドデシル硫酸ナトリウムを1ml加え(最終濃度約1%となる)、これを70℃・30分間のインキュベートにより溶菌した後、フェノール処理とエタノール沈澱を行った。得られたDNAを10mMト

リス (pH 8.0) / 1 mM EDTA 緩衝液 (TE) に溶解した。

【0047】

得られたDNAを各種濃度に調製し、制限酵素Sau3AI（宝酒造）を用いて37℃で15分間処理して部分分解を行った。この部分分解物の一部を0.8%のアガロースゲル電気泳動にかけ、主に5~10 kb程度の部分分解されている試料を確認し、この試料をスピンドラムHR-400（ファルマシア）にかけてDNA断片を精製した。

【0048】

このDNA断片を、制限酵素BamHI（宝酒造）で完全分解・脱リン酸化 (BAP: 宝酒造) 処理したプラスミドpUC18（宝酒造）にDNA Ligation Kit Ver. 2（宝酒造）を用いてライゲートし、得られた組換えプラスミドを宿主である大腸菌HB101（宝酒造）に導入した。これを選択薬剤としてアンピシリン100 μg/mlを含み、またトルエンモノオキシゲナーゼ活性の指標として200 ppmフェノールを含むLB培地プレートに塗布し、生育可能な形質転換体を約15,000コロニー得ることができた。

【0049】

さらにこれらのコロニーの中で褐色を呈するコロニーを選択したところ、8個のコロニーが得られた。8個のコロニーを培養することにより得られた菌体から、トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を有する組換えプラスミドを抽出し、制限酵素地図を作成した。その結果、8個のコロニー由来すべての組換えプラスミドは5.8 kbの共通挿入断片を有しており、その中で5.8 kbの共通断片のみを含むプラスミドをpKKO1とし、挿入DNA断片の制限酵素地図を作成した（図1参照）。

【0050】

pKKO1に挿入されたDNA断片がKKO1株由来のものであることを確認するために、サザンハイブリダイゼーションを行った。pKKO1に挿入されたDNAの制限酵素BamHI-KpnI（宝酒造）断片、約1.6 kbをプローブとし、KKO1株より抽出したDNAをEcoRI（宝酒造）、XbaI（宝酒造）の各制限酵素で完全分解したものについてサザンプロティングを行った。この結果、制限酵素

EcoRI により完全分解したものについては約4.3 kb付近に強いシグナルが、制限酵素XbaIにより完全分解したものについては約4.2 kb付近に強いシグナルが観察され、これらは制限酵素地図から予想される断片長と良好に一致した。これより、pKKO1に含まれるトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子がKKO1株由来のものであることが確かめられた。

【0051】

<実施例2>

pKKO1組換え大腸菌 (HB101) でのモノオキシゲネーションの確認

pKKO1組換え大腸菌 (HB101) を100mlのLB培地に植菌し、37°Cで一晩培養した後に集菌、洗浄し、M9培地 (1リットル中にNa₂HPO₄ : 6.2g, KH₂PO₄ : 3.0g, NaCl : 0.5g, NH₄Cl : 1.0gを含む) に下記組成のミネラル溶液 (M9培地1リットル中に3ml) を加えたもの (以下M9+ミネラル溶液という) 100mlに再懸濁した。

ミネラル溶液の組成 :

ニトリロ三酢酸 : 1.5g

MgSO₄ : 3.0g

CaCl₂ : 0.1g

Na₂MoO₄ : 0.1g

FeSO₄ : 0.1g

MnSO₄ : 0.5g

NaCl : 1.0g

ZnSO₄ : 0.1g

CuSO₄ : 0.1g

Al₂(SO₄)₃ : 0.1g

H₃BO₃ : 0.1g

NiCl₂ : 0.1g

蒸留水 (全量で1000mlとする)

27.5ml容バイアル瓶に上記懸濁液を10ml加え、テフロンコートブルゴム栓およびアルミシールで密閉し、ガス状のトルエンおよびベンゼンをそれ

ぞれバイアル瓶中の水分濃度が100 ppm (全てのトルエン、ベンゼンが水中に溶解したときの濃度) となるようにシリングで加え、30℃で3時間培養した後にそれぞれ1mlを回収した。遠心分離により大腸菌を除き、さらに限外濾過によって分子量10,000以上の高分子を除いた後、HPLCによりトルエンについてはオルトクレゾール、3-メチルカテコールの生成を、ベンゼンについてはフェノールおよびカテコールの生成を確認した。これよりクローニングしたDNA断片がコードするトルエンモノオキシゲナーゼによりトルエン、ベンゼンがモノオキシゲネーションされていることがわかる。

【0052】

<実施例3>

(pKKO1組換え大腸菌 (HB101) の芳香族化合物および揮発性有機塩素化合物分解能)

実施例2のようにして培養したpKKO1組換え大腸菌 (HB101) を、M9培地+ミネラル溶液に懸濁した。これを27.5ml容バイアル瓶に10ml加え、テフロンコートブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、ガス状のトリクロロエチレン (TCE) 、シス-1,2-ジクロロエチレン (cis-1,2-DCE) 、トランス-1,2-ジクロロエチレン (trans-1,2-DCE) 、1,1-ジクロロエチレン (1,1-DCE) 、トルエン、ベンゼンを個々にバイアル瓶中の水分中での濃度が5 ppm (全てが水中に溶解したときの濃度) となるようにシリングで加え、30℃で振盪・保温し、気相部分の各化合物の量をガスクロマトグラフィーによって定量し、それぞれの6時間後の濃度を測定した。結果を表1に示す。ここで対照として、pUC18のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価した。

【0053】

また同様の系でTCEをバイアル瓶中の水分中での濃度が10 ppm (全てが水中に溶解したときの濃度) となるようにシリングで加え、30℃で振盪・保温し、気相部分でTCE量がガスクロマトグラフィーによって経時的に定量した結果を図2に示す。

【0054】

【表1】

表1

| | pKK01組換えHB101 | HB101 |
|---------------|---------------|-------|
| TCE | 0 | 5.2 |
| cis-1,2-DCE | 0 | 4.9 |
| trans-1,2-DCE | 0 | 5.1 |
| 1,1-DCE | 0 | 5.3 |
| トルエン | 0 | 5.5 |
| ベンゼン | 0 | 4.9 |

(単位は ppm)

また、同様にして27.5ml容バイアル瓶に10ml調製した菌懸濁液に、フェノール、オルトクレゾール、メタクレゾール、パラクレゾールをそれぞれ50ppmとなるように加え、ブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、30℃で振盪・保温し、液相部分の各化合物の量をアミノアンチピリン法によって分光光度計にて定量し、それぞれの6時間後の濃度を測定した。結果を表2に示す。ここで対照として、pUC18のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価した。

【0055】

【表2】

表2

| | pKK01組換えHB101 | HB101 |
|----------|---------------|-------|
| フェノール | 0 | 5.5 |
| オルトクレゾール | 0 | 4.9 |
| メタクレゾール | 0 | 4.7 |

| | | |
|---------|---|----|
| パラクレゾール | 0 | 52 |
|---------|---|----|

(単位は p p m)

以上の結果から、pKKO1組換え大腸菌(HB101)は優れた芳香族化合物および揮発性有機塩素化合物分解能を有することがわかる。

【0056】

<実施例4>

(トルエンモノオキシゲナーゼ領域の限定)

実施例1で得られたpKKO1について、制限酵素切断部位を利用したサブクローニング、あるいは段階欠失法を用いてトルエンモノオキシゲナーゼ領域の限定を行った。トルエンモノオキシナーゼ活性の評価は実施例3の方法で行い、基質として5 p p mトルエンを用いた。

【0057】

まず、pKKO1の0.7 k bのBamHI切断部位を利用し、0.7 k b断片を欠失させたサブクローンpKKO1 Δ BamHIを作成した。具体的には、pKKO1をBamHI、HindIII(宝酒造)の各制限酵素により完全分解し3.4 k b、5.1 k bの2断片を得た。これをアガロースゲル電気泳動により分離してゲルから5.1 k b断片を切り出し回収し、スピンカラムHR-400(ファルマシア)で精製した。この断片をBamHI、HindIIIの各制限酵素により完全分解したpUC18にライゲートし、常法により大腸菌HB101を形質転換の後100 μ g/m1アンピシリン含有LBプレートに塗布し、形質転換体を得た。形質転換体をLB培地で終夜培養の後、アルカリ法により組換えプラスミドを抽出してpKKO1 Δ BamHIの確認を行い、これを保持する形質転換体を得た。pKKO1 Δ BamHI組換え大腸菌(HB101)を用いてトルエンモノオキシゲナーゼ活性の評価を行ったが、トルエンの分解は観察されず、この0.7 k b断片はトルエンモノオキシゲナーゼ活性に必須な領域であることが明らかとなった。

【0058】

次に、pKKO1の0.3 k bのEcoRI切断部位を利用し、0.3 k b断片を欠失させたサブクローンpKKO1 Δ EcoRIを作成した。具体的には、pKKO

1をEcoRIにより部分分解し、これを用いてセルフライゲート、大腸菌HB101の形質転換を行い、100μg/mlアンピシリン含有LBプレートに塗布し、形質転換体を得た。形質転換体をLB培地で終夜培養の後、アルカリ法により組換えプラスミドを抽出してpKKO1ΔEcoRIの確認を行い、これを保持する形質転換体を得た。pKKO1ΔEcoRI組換え大腸菌(HB101)を用いてトルエンモノオキシゲナーゼ活性の評価を行ったところ、トルエンの分解が観察された。しかしながらpKKO1組換え大腸菌(HB101)に比較してその活性は低く、この0.3kb断片はトルエンモノオキシゲナーゼ活性に必須な領域ではないものの活性の十分な発現には必要な領域であることがわかった。

【0059】

さらに段階欠失法により、トルエンモノオキシゲナーゼ領域の逆方向からの限 定を行った。具体的には、pKKO1のXbaI(宝酒造)切断部位とSse83871(宝酒造)切断部位を利用し、XbaI切断部位からの段階欠失を導入した。段階欠失は Kilo-Sequence用Deletion Kit(宝酒造)を用い、実験方法は添付のプロトコルに従った。このようにして得られた各種欠失クローンにおける活性評価の結果から、4.9kbまでの領域は活性発現に必須であり、4.9kbから5.8kbの領域は分割活性に特に必要でないことが明らかになった。

【0060】

<実施例5>

(トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子の塩基配列決定)

pKKO1の塩基配列は以下のようにして決定した。pKKO1を各制限酵素により切り出した後にpUC18プラスミドにサブクローニングし、必要に応じてpKKO1あるいはpKKO1の部分断片を含むサブクローンからKilo-Sequence用Deletion Kit(宝酒造)を用いて欠失クローンを作成し、トルエンモノオキシゲナーゼをコードする5.8kb断片についてダイオキシ法により塩基配列を決定した。ダイオキシ法はABI PRISM CyCle Sequencing Kit(パーキンエルマー)を用いて行い、反応条件などは添付のプロトコルに従った。また、DNA組換え、キロシーケンス法などについても常法をあるいはメーカー添付のプロトコルに従った。塩基配列解析の結果、トルエンモノオキシゲナーゼをコードするDN

Aの配列は、配列表の配列番号：1に示すように、7つのコード領域を含む5828塩基配列であることが明らかになった。

【0061】

ここで実施例4の結果を合わせて考えると、該配列において、*tomK*がコードするポリペプチド(*TomK*)は活性の発現に必須ではないが、*TomK*の存在によりトルエンモノオキシゲナーゼ活性は明らかに向上する。このため*TomK*がトルエンモノオキシゲナーゼのコンポーネントとして含まれることが十分な活性発現のために望ましい。また、*tomQ*がコードするポリペプチド(*TomQ*)は活性の発現に必須ではない。また、*TomQ*の存在の有無にトルエンモノオキシゲナーゼ活性は影響されず、このため*TomQ*がトルエンモノオキシゲナーゼのコンポーネントとして含まれることは特に必須ではない。

【0062】

ここで*tomK*の第1(1st)ATG(216番目から218番目の塩基)の前にはSD配列に相当する配列が存在せず、第2(2nd)ATG(234番目から236番目の塩基)の前にSD配列が存在する。このため、以下の配列表においては、234番目からの塩基によりコードされるポリペプチドを*TomK*として表示している。

【0063】

さらに*tomL*の1st ATG(391番目から393番目の塩基)の前にSD配列に相当する配列が存在せず、463番目から465番目の塩基のGTGの前のSD配列が存在する。このため、以下の配列表においては、463番目からの塩基によりコードされるポリペプチドを*TomL*として表示している。

【0064】

＜実施例6＞

(トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子の発現ベクターへの組換え)

発現ベクターとしてpTrc99A(ファアルマシア)、pSE280(Invitrogen)、pSE380(Invitrogen)を用いた。それぞれマーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を含み、oriとしてのpTrc99AはpBR322由来の配列が、pSE289/380はColE1由来のものが含まれている。3ベクターともにtrcプロモータとrrnBターミネータを含み

、リボゾーム結合部位がNcoI切断部位の前に配置されている。pTrc99AとpSE380にはlacIqが含まれるが、pSE280にはlacIqは提供されていない。

【0065】

これらのベクターにトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を組換えるために、tomK, tomLにNcoI切断部位の導入を行った。PCRによるNcoI切断部位の導入を行うため以下の5本のプライマを用意した（宝酒造）。

【0066】

- 1) tom-K1 5' -AGTCCGCCATGGAGGCGACACCGATCATGAATCAGC-3' 36mer
- 2) tom-K2 5' -CACCGACCATGGATCAGCACCCCACCGATCTTC-3' 34mer
- 3) tom-L1 5' -TGCGGCCTTCCATGGGTCTGCCGCGAACAGCAG-3' 34mer
- 4) tom-L2 5' -AGCAAGCCATGCCATCGAGCTGAAGACAGTCGACATCA-3' 39mer
- 5) tail 5' -CCGACCATCACCTGCTCGGCCAGATGGAAGTCGAG-3' 35mer

ここで、tom-K1はtomKの1st ATG部位（配列表の216番目から218番目の塩基）にNcoI切断部位が導入されるように設計した。同様に、tom-K2はtomKの2nd ATG部位（配列表の234番目から236番目の塩基）に、tom-L1はtomLの1st ATG部位（配列391番目から393番目の塩基）に、tom-L2はtomLの1st GTG部位（配列表の463番目から465番目の塩基）にそれぞれNcoI切断部位が導入されるように設計した。これら1)から4)の各種プライマと5)のプライマを組み合わせてPCRを行った。PCRはTaKaRa LA PCR Kit Ver. 2（宝酒造）を用いて行い、50 μlの反応容量で、反応は94°C・1分の後、98°C、20秒→72°C、5分を30サイクル繰り返すシャトルPCRとし、最後の72°C、10分の反応を行った。反応条件などは添付のプロトコルに拠った。

【0067】

この結果、1)～5)では約5.6kb、2)～5)では約5.6kb、3)～5)では約5.4kb、4)～5)では約5.4kbのPCR産物を得ることができた。これらの各DNA断片を制限酵素NcoI（宝酒造）により切断したところ、それぞれ約5.0kb、約5.0kb、約4.9kb、約4.8kbの各断片と、約0.6kbの断片が得られた。これよりPCR産物は制限酵素NcoIにより完全に分解されたことがわかる。これらのNcoI分解物はスピンカラムHR-4

00 (ファルマシア) により精製し、次のライゲーション反応に用いた。

【0068】

発現ベクターはそれぞれ制限酵素NcoIで完全分解し、脱リン酸化の後にフェノール処理を行い、スピンカラムHR-400 (ファルマシア) により精製した。これらを上記PCR 産物のNcoI分解物とライゲートし、常法により大腸菌HB101 (宝酒造) を形質転換の後に100 μg/ml アンピシリン含有LBプレートに塗布し、形質転換体を得た。これらの形質転換体をLB培地で37℃終夜培養の後、アルカリ法によりプラスミドを抽出して組換えプラスミドのチェックを行い、それぞれの断片が各発現ベクターのNcoI切断部位に正しく挿入された形質転換体を得た。

【0069】

得られた組換えプラスミドの一覧を表3に示す。

【0070】

【表3】

表3

| | tom-K1 | tom-K2 | tom-L1 | tom-L2 |
|---------|--------|--------|--------|--------|
| pTrc99A | pK19 | pK29 | pL19 | pL29 |
| pSE280 | pK12 | pk22 | pL12 | pL22 |
| pSE380 | pK13 | pK23 | pL13 | pL23 |

<実施例7>

(発現ベクター組換え大腸菌 (HB101) の芳香族化合物および揮発性有機塩素化合物分解能 (IPTGによる誘導なし))

実施例6のようにして得られた12種類の組換えプラスミドをそれぞれ含む大腸菌 (HB101) を100mlのLB培地に植菌し、37℃で一晩培養した後に集菌、洗浄し、M9培地+ミネラル溶液に懸濁した。これを27.5ml容バイアル瓶に10ml加え、テフロンコートブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し

、ガス状のトリクロロエチレン (TCE) 、シス-1, 2-ジクロロエチレン (cis-1,2-DCE) 、トランス-1, 2-ジクロロエチレン (trans-1,2-DCE) 、1, 1-ジクロロエチレン (1,1-DCE) 、トルエン、ベンゼンを個々にバイアル瓶中の水分中での濃度が 20 ppm (全てが水中に溶解したときの濃度) となるようシリンジで加え、30°Cで振盪・保温し、気相部分の各化合物の量がガスクロマトグラフィーによって定量し、それぞれの 6 時間後の濃度を測定した。結果を表4に示す。ここで対照として、pSE280のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価した。

【0071】

【表4】

表4

| | pK19 | pK29 | pL19 | pL29 | pK12 | pK22 | pL12 | pL22 |
|---------------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| TCE | 4.5 | 5.2 | 7.8 | 7.5 | 0 | 0 | 0.4 | 0.2 |
| cis-1,2-DCE | 2.5 | 2.4 | 3.8 | 4.5 | 0 | 0 | 2.1 | 3.2 |
| trans-1,2-DCE | 3.1 | 4.2 | 5.2 | 5.8 | 0 | 0 | 1.5 | 1.4 |
| 1,1-DCE | 7.2 | 6.6 | 8.9 | 9.1 | 0 | 0 | 1.2 | 0.9 |
| トルエン | 1.3 | 1.1 | 2.5 | 3.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ベンゼン | 4.8 | 5.1 | 7.3 | 6.8 | 0 | 0 | 0.9 | 0.5 |
| <hr/> | | | | | | | | |
| | pK13 | pK23 | pL13 | pL23 | HB101 | | | |
| TCE | 3.8 | 4.3 | 5.5 | 5.3 | 20.1 | | | |
| cis-1,2-DCE | 0.9 | 0.7 | 1.5 | 1.8 | 18.9 | | | |
| trans-1,2-DCE | 1.2 | 1.1 | 2.1 | 2.1 | 19.8 | | | |
| 1,1-DCE | 2.5 | 2.4 | 5.1 | 4.9 | 20.7 | | | |
| トルエン | 1.2 | 0.9 | 1.8 | 1.7 | 21.0 | | | |
| ベンゼン | 3.5 | 3.3 | 4.8 | 4.4 | 20.2 | | | |

(単位はppm)

また、同様にして27.5ml容バイアル瓶に10ml調製した菌懸濁液に、フェノール、オルトクレゾール、メタクレゾール、パラクレゾールをそれぞれ50ppmとなるように加え、ブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、30℃で振盪・保温し、液相部分の各化合物の量をアミノアンチピリン法によって分光光度計にて定量し、それぞれの6時間後の濃度を測定した。結果を表5に示す。ここで対照として、PSE280のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価した。

【0072】

【表5】

表5

| | pK19 | pK29 | pL19 | pL29 | pK12 | pK22 | pL12 | pL22 |
|----------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| フェノール | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| オルトクレゾール | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| メタクレゾール | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| パラクレゾール | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | |
| | pK13 | pK23 | pL13 | pL23 | HB101 | | | |
| フェノール | 0 | 0 | 0 | 0 | 50.6 | | | |
| オルトクレゾール | 0 | 0 | 0 | 0 | 52.5 | | | |
| メタクレゾール | 0 | 0 | 0 | 0 | 53.1 | | | |
| パラクレゾール | 0 | 0 | 0 | 0 | 50.5 | | | |

(単位はppm)

以上の結果から、発現ベクター組換え大腸菌(HN101)は優れた芳香族化合物お

および揮発性有機塩素化合物分解能を有することが確認できる。また、pTrc99A ならびにpSE380に組換えたものについてはベクター中にlacIq が存在することから、IPTGを含まない系での分解活性はpSER280に組換えたものに比較し抑制されていることがわかる。

【0073】

<実施例8>

(発現ベクター組換え大腸菌(HB101) の芳香族化合物および揮発性有機塩素化合物分解能 (IPTGによる誘導あり))

実施例6のようにして得られた12種類の組換えプラスミドをそれぞれ含む大腸菌 (HB101)を100mlのLB培地に植菌し、37℃でOD600が約0.8になるまで培養し、ここでIPTGを最終濃度1mMとなるように加え、さらに37℃で5時間培養を継続した。その後集菌、洗浄し、M9培地+ミネラル溶液に懸濁した。これを27.5ml容バイアル瓶に10ml加え、テフロンコートブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、ガス状のトリクロロエチレン (TCE) 、シス-1, 2-ジクロロエチレン (cis-1,2-DCE) 、トランス-1, 2-ジクロロエチレン (trans-1,2-DCE) 、1, 1-ジクロロエチレン (1,1-DCE) 、トルエン、ベンゼンを個々にバイアル瓶中の水分中での濃度が20ppm (全てが水中に溶解したときの濃度) となるようにシリンジで加え、30℃で振盪・保温し、気相部分の各化合物の量がガスクロマトグラフィーによって定量し、それぞれの6時間後の濃度を測定した。結果を表6に示す。ここで対照として、pSE280のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価した。

【0074】

【表6】

表6

| | pK19 | pK29 | pL19 | pL29 | pK12 | pK22 | pL12 | pL22 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| TCE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.7 | 0.5 |
| cis-1,2-DCE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.9 | 2.1 |

| | | | | | | | | |
|---------------|------|------|------|------|-------|---|-----|-----|
| trans-1,2-DCE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.9 | 1.9 |
| 1,1-DCE | 0 | 0 | 0.7 | 0.5 | 0 | 0 | 0.8 | 0.7 |
| トルエン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ベンゼン | 0 | 0 | 1.2 | 2.1 | 0 | 0 | 1.3 | 0.9 |
| <hr/> | | | | | | | | |
| | pK13 | pK23 | pL13 | pL23 | HB101 | | | |
| <hr/> | | | | | | | | |
| TCE | 0 | 0 | 0 | 0 | 21.2 | | | |
| cis-1,2-DCE | 0 | 0 | 0 | 0 | 19.9 | | | |
| trans-1,2-DCE | 0 | 0 | 0 | 0 | 20.7 | | | |
| 1,1-DCE | 0 | 0 | 0 | 0 | 19.8 | | | |
| トルエン | 0 | 0 | 0 | 0 | 20.5 | | | |
| ベンゼン | 0 | 0 | 0.3 | 0.1 | 21.0 | | | |
| <hr/> | | | | | | | | |

(単位は ppm)

また、同様にして27.5ml容バイアル瓶に10ml調製した菌懸濁液に、フェノール、オルトクレゾール、メタクレゾール、パラクレゾールをそれぞれ50ppmとなるように加え、ブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、30℃振盪・保温し、液相部分の各化合物の量をアミノアンチピリン法によって分光光度計にて定量し、それぞれの6時間後の濃度を測定した。結果を表7に示す。ここで対照として、PSE280のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価した。

【0075】

【表7】

表7

| | | | | | | | | |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | pK19 | pK29 | pL19 | pL29 | pK12 | pK22 | pL12 | pL22 |
| フェノール | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | |
|--------------|------|------|------|------|-------|---|---|--|
| オルトクレゾール 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| メタクレゾール 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| パラクレゾール 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <hr/> | | | | | | | | |
| | pK13 | pK23 | pL13 | pL23 | HB101 | | | |
| <hr/> | | | | | | | | |
| フェノール 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50.0 | | | |
| オルトクレゾール 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 51.1 | | | |
| メタクレゾール 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52.3 | | | |
| パラクレゾール 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 47.9 | | | |
| <hr/> | | | | | | | | |

(単位は ppm)

以上の結果から、発現ベクター組換え大腸菌(HB101)は優れた芳香族化合物および揮発性有機塩素化合物分解能を有することが確認できる。また、pTrc99AならびにpSE380に組換えたものについては、IPTGで誘導をかけることによりさらに優れた分解活性を発揮することがわかる。

＜実施例9＞

(pK22, pK23組換え大腸菌 (HB101)の土壤中でのTCE分解 (IPTGによる誘導なし))

実施例6のようにして得られたpK22およびpK23組換え大腸菌(HB101)をそれぞれ10mlのLB培地に植菌し、37℃で一晩培養した。68ml容バイアル瓶に佐原通し砂(未滅菌)50gを入れ、上記のようにして培養した菌液を5mlのLB培地に1/100量接種し、その砂中に加えた。綿栓をして37℃で8時間静置培養した後、テフロンコートブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、ガス状のTCEをバイアル瓶中の水分中での濃度が20ppm(全てのTCEが水中に溶解したときの濃度)となるようにシリンジで加え、30℃で保温した。気相部分のTCEの量をガスクロマトグラフィーによって定量し、6時間後の濃度を測定した。結果を表8に示す。ここで対照として、pSE280のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価した。

【0076】

【表8】

表8

| | pK22 | pK23 | HB101 |
|-----|------|------|-------|
| TCE | 0 | 2.4 | 20.8 |

(単位は ppm)

以上の結果から、pK22あるいはpK23組換え大腸菌(HB101)は土壌中においても優れたTCE分解能を有することが確認できる。ここで、pSE380に組換えたもの(pK23)についてはベクター中にlacIqが存在することから、IPTGを含まない系での分解活性はpSE280に組替えたもの(pK22)に比較し抑制されていることがわかる。

【0077】

<実施例10>

(pK22, pK23組換え大腸菌(HB101)の土壌中でのTCE分解(IPTGによる誘導あり))

実施例6のようにして得られたpK22およびpK23組換え大腸菌(HB101)をそれぞれ10mlのLB培地に植菌し、37℃で一晩培養した。68ml容バイアル瓶に佐原通し砂(未滅菌)50gを入れ、上記のようにして培養した菌液を5mlのLB培地に1/100量接種し、その砂中に加えた。綿栓をして37℃で4時間静置培養した後、10mMのIPTG溶液1mlをさらにその砂中に加え、綿栓をして37℃でさらに4時間静置培養を行った。その後、テフロンコートブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、ガス状のTCEをバイアル瓶中の水分中の濃度が20ppm(全てのTCEが水中に溶解したときの濃度)となるようにシリングで加え、30℃で保温した。気相部分のTCEの量をガスクロマトグラフィーによって定量し、6時間後の濃度を測定した。結果を表9に示す。ここで対照として、pSE280のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価

した。

【0078】

【表9】

表9

| | pK22 | pK23 | HB101 |
|-----|------|------|-------|
| TCE | 0 | 0 | 20.3 |

(単位は ppm)

以上の結果から、pK22あるいはpK23組換え大腸菌(HB101)は土壤中においても優れたTCE分解能を有することが確認できる。また、pSE380に組換えたもの(pK23)については、IPTGで誘導をかけることによりさらに優れた分解活性を発揮することがわかる。

【0079】

<実施例11>

pK22, pK23組換え大腸菌(HB101)の土壤中でのTCE分解(IPTGによる誘導なし)

実施例6のようにして得られたpK22およびpK23組換え大腸菌(HB101)をそれぞれ100mlのLB培地に植菌し、37℃で一晩培養した。上記培養液30mlを68ml容バイアル瓶に移し、これにTCE飽和溶液中で曝気した空気を流量20ml/分で溶液中に10分間流した後、テフロンコートブチルゴム栓、アルミシールで密閉し、30℃で振盪培養を行った。気相部分のTCEの量をガスクロマトグラフィーによって定量し、6時間後の濃度を測定した。結果を表10に示す。ここで対照として、pSE280のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価した。

【0080】

【表10】

表10

| | pK22 | pK23 | HB101 |
|-----|------|------|-------|
| TCE | 0 | 12.1 | 47.9 |

(単位は ppm)

以上の結果から、pK22あるいはpK23組換え大腸菌(HB101)は気相中のTCE分解においても優れたTCE分解能を有することが確認できる。ここで、pSE380に組換えたもの(pK23)についてはベクター中にlacIqが存在することから、IPTGを含まない系での分解活性はpSE280に組替えたもの(pK22)に比較し抑制されていることがわかる。

<実施例12>

(pK22, pK23組換え大腸菌(HB101)の土壤中でのTCE分解(IPTGによる誘導あり))

実施例6のようにして得られたpK22およびpK23組換え大腸菌(HB101)をそれぞれ100mlのLB培地に植菌し、37℃でOD600が約0.8になるまで培養し、ここでIPTGを最終濃度1mMとなるように加え、さらに37℃で5時間培養を継続した。上記培養液30mlを68ml容バイアル瓶に移し、これをTCE飽和溶液中で曝気した空気を流量20ml/分で溶液中に10分間流した後、テフロンコートブチルゴム栓、アルミシールで完全密封し、30℃で振盪培養を行った。気相部分のTCEの量をガスクロマトグラフィーによって定量し、6時間後の濃度を測定した。結果を表11に示す。ここで対照として、pSE280のみを含むHB101についても同様の系で分解を評価した。

【0081】

【表11】

表11

| | pK22 | pK23 | HB101 |
|--|------|------|-------|
|--|------|------|-------|

| T C E | 0 0 5 4 . 2 |

(単位は ppm)

以上の結果から、pK22あるいはpK23組換え大腸菌(HB101)は気相中のTCE 分解においても優れたTCE分解能を有することが確認できる。また、pSE380に組換えたもの(pK23)については、IPTGで誘導をかけることによりさらに優れた分解活性を発揮することがわかる。

【0082】

<実施例13>

(トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子組換えプラスミドのアルカリゲネス・スピーサイズTL2株への導入)

tomKの2st ATG部分(配列表の234番目から236番目の塩基)からの配列を含むトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を、発現ベクターpTrc99Aに組換えたプラスミド、pK29(実施例6)をもとに、不和合性グループであるIncP, IncQ,あるいはIncWのいずれにも属さない広宿主域複製領域を含むベクターpBBR122(Mo Bi Tec)を組換え、この組換えプラスミドをビブリオ・スピーサイズKB1株に導入し、芳香族化合物および揮発性有機塩素化合物分解能の評価を行った。

【0083】

まず広宿主域組換えプラスミドの作成を行った。実施例6で作成したpK29より、トルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子、trcプロモータ、rrnBターミネータを含む約7.0 kb領域を、制限酵素HpaI(宝酒造)と制限酵素ScaI(宝酒造)を用いることにより切り出した。ここでこの約7.0 kb断片中にはlacIq配列は含まれない。広宿主域ベクターとしてはpBBR122を用い、これを制限酵素SmaI(宝酒造)により完全分解した。上記のようにして調製したトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子、trcプロモータ、rrnBターミネータを含む約7.0 kb領域を、pBBR122のSmaI切断部位にDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造)を用いてライゲートし、得られた組換えプラスミドを宿主である大腸菌HB101(宝酒造)に導入した。これを選択薬剤としてクロラムフェニコール50 μg/mlを含むLB培地プレートに塗布し、生育可能な形質転換体を得た。プレート上のコロニーが適当な大きさ

にまで生育したところ、このプレートを選択薬剤としてカナマイシン 50 μ g/m1 を含む LB 培地プレートにレプリカした。コロニーが生育してきたところで、クロラムフェニコール含有プレートでは増殖できるがカナマイシン含有プレートでは増殖できないような形質転換体を選択し、LB 培地で 37℃ 終夜培養の後、アルカリ法によりプラスミドを抽出して組換えプラスミドのチェックを行い、約 7.0 kb 領域が pBBR122 の SmaI 切断部位に正しく挿入された形質転換体を得た。ここで得られた組換えプラスミドは約 12.3 kb の長さであり、pK29bbr とした。

【0084】

ビブリオ・スピーシズ KB 1 株の液体培養には下記の SOB 培地を使用した。選択薬剤としてクロラムフェニコールを 50 μ g/m1 の濃度で用い、培養温度は 30℃ に設定した。ビブリオ・スピーシズ KB 1 株への組換えプラスミド pK29bbr の導入はバイオラッド社製のジーンパルサーを利用したエレクトロポーリーション法により行った。組換えプラスミド pK29bbr は、ビブリオ・スピーシズ KB 1 株に導入した場合、安定に維持された。

【0085】

SOB 培地：

トリプトン： 20 g

酵母エキス： 5 g

NaCl： 0.5 g

250 mM KC1： 10 ml

蒸留水（全量で 990 ml とする）

pH 7.0

上記溶液をオートクレープで滅菌し室温まで冷却した後、これとは別にオートクレープにより滅菌した 2M Mg 溶液 (1M MgSO₄ · 7H₂O + 1M MgCl₂ · 6H₂O) を 10 ml 加える。

【0086】

＜実施例 14＞

pK29bbr 組換えビブリオ・スピーシズ KB 1 株の芳香族化合物および揮発性有

機塩素化合物分解能

pK29bbr組換えビブリオ・スピーシズKB1株を100mlのSOB培地に植菌し、30℃で一晩培養した後に集菌、洗浄し、M9培地（1リットル中にNa₂HPO₄ : 6.2g, KH₂PO₄ : 3.0g, NaCl : 0.5g, NH₄Cl : 1.0gを含む）にミネラル溶液（M9培地1リットル中に3ml）を加えたもの100mlに再懸濁した。

【0087】

これを27.5ml容バイアル瓶に10ml加え、テフロンコートブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、ガス状のトリクロロエチレン（TCE）、シス-1,2-ジクロロエチレン（cis-1,2-DCE）、トランス-1,2-ジクロロエチレン（trans-1,2-DCE）、1,1-ジクロロエチレン（1,1-DCE）、トルエン、ベンゼンを個々にバイアル瓶中の水分中での濃度が20ppm（全てが水中に溶解したときの濃度）となるようにシリンジで加え、30℃で振盪、保温し、気相部分の各化合物の量をガスクロマトグラフィーによって定量し、それぞれの6時間後の濃度を測定した。結果を表12示す。ここで対照として、pBBR122のみを含むビブリオ・スピーシズKB1株についても同様の系で分解を評価した。

【0088】

【表12】

表12

| | pK29bbr組換えKB1 | KB1 |
|---------------|---------------|------|
| TCE | 0 | 19.1 |
| cis-1,2-DCE | 0 | 20.2 |
| trans-1,2-DCE | 0 | 21.3 |
| 1,1-DCE | 0 | 19.2 |
| トルエン | 0 | 19.8 |
| ベンゼン | 0 | 21.0 |

(単位は ppm)

また、同様にして 27.5 ml 容バイアル瓶に 10 ml 調製した菌懸濁液に、フェノール、オルトクレゾール、メタクレゾール、パラクレゾールをそれぞれ 50 ppm となるように加え、ブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、30℃で振盪・保温し、液相部分の各化合物の量をアミノアンチピリン法によって分光光度計にて定量し、それぞれの 6 時間後の濃度を測定した。結果を表 13 に示す。ここで対照として、pBBR122 のみを含むビブリオ・スピーシズ KB1 株についても同様の系で分解を評価した。

【0089】

【表 13】

表 13

| | pK29bbr組換え KB1 | KB1 |
|----------|----------------|-----|
| フェノール | 0 | 51 |
| オルトクレゾール | 0 | 50 |
| メタクレゾール | 0 | 49 |
| パラクレゾール | 0 | 50 |

(単位は ppm)

以上の結果から、pK29bbr の組換えビブリオ・スピーシズ KB1 株は優れた芳香族化合物および揮発性有機塩素化合物分解能を構成的に発現できることがわかる。

【0090】

<実施例 15>

(pK29bbr組換えビブリオ・スピーシズ KB1 株の土壤中でのTCE分解)

実施例 13 のようにして得られた pK29bbr 組換えビブリオ・スピーシズ KB1 株を SOB 培地に植菌し、30℃で一晩培養した。68 ml 容バイアル瓶に佐原通し砂（未滅菌）50 g を入れ、上記のようにして培養した菌液を 5 ml の SO

B培地に1/100量接種し、その砂中に加えた。綿栓をして30℃で12時間静置培養した後、テフロンコートブチルゴム栓およびアルミシールで密閉し、ガス状のTCEをバイアル瓶中の水分中での濃度が20 ppm（全てのTCEが水中に溶解したときの濃度）となるようにシリンジで加え、30℃で保温した。気相部分のTCEの量をガスクロマトグラフィーによって定量し、6時間後の濃度を測定した。結果を表14に示す。ここで対照として、pBBR122のみを含むビブリオ・スピーシズKB1株についても同様の系で分解を評価した。

【0091】

【表14】

表14

| pK29bbr組換えKB1 | | KB1 |
|---------------|---|------|
| TCE | 0 | 20.2 |

（単位はppm）

以上の結果からpK29bbr組換えビブリオ・スピーシズKB1株は土壤中においても優れたTCE分解能を構成的に発現できることがわかる。

【0092】

<実施例16>

pK29bbr組換えビブリオ・スピーシズKB1株の気相中でのTCE分解実施例13のようにして得られたpK29bbr組換えビブリオ・スピーシズKB1株をSOB培地に植菌し、30℃で一晩培養した。上記培養液30mlを68ml容バイアル瓶に移し、これをTCE飽和溶液中で曝気した空気を流量20ml/分で溶液中に10分間流した後、テフロンコートブチルゴム栓およびアルミシールで完全密封し、30℃で振盪培養を行った。気相部分のTCEの量をガスクロマトグラフィーによって定量し、6時間後の濃度を測定した。結果を表15に示す。ここで対照として、pBBR122のみを含むビブリオ・スピーシズKB1株についても同様の系で分解を評価した。

【0093】

【表15】

表15

| pK29bbr組換えKB1 | | KB1 |
|---------------|---|------|
| TCE | 0 | 52.1 |

(単位は ppm)

以上の結果から、pK29bbr組換えビブリオ・スピーシズKB1株は気相中のTCE分解においても優れたTCE分解能を構成的に発現できることがわかる。

【0094】

【発明の効果】

本発明により芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物の分解能に優れたトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片が得られる。また、該DNA断片の全部あるいは部分を含む、芳香族化合物および／あるいは揮発性塩素化合物を分解可能な形質転換体を得る際に利用できる新規な組換えプラスミドを得ることができる。さらに、該プラスミドを保持し、芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物の分解に利用できる形質転換体が得られる。さらには、該形質転換体を利用することにより、芳香族化合物および／あるいは揮発性有機塩素化合物を効率よく分解可能であり、実用的な環境修復方法を提供することができる。

【0095】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：5828

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：染色体DNA

配列の特徴：

234～443 : TomKのコード領域

462～1455 : TomLのコード領域

1495～1761 : TomMのコード領域

1803～3350 : TomNのコード領域

3428～3781 : TomOのコード領域

3810～4871 : TomPのコード領域

4876～5229 : TomQのコード領域

配列

| | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| GATCATTCA | TCAAATGCGC | TCGAGCGGGT | TGCTCAAATG | ATGAAAAAGG | CCACCGGACA | 60 |
| TGGGTTTCGG | CACGATCGCC | GGCGGGCGTT | TTCCGTTCTG | GTAAACCGCC | ATTGTGGGTC | 120 |
| GCGAAATTAA | ACTTCGCGTC | AGGGCTTCC | CTGAATTATC | GAGATTTTT | GCTGCCTGGG | 180 |
| TCGAACGTGG | CACGGATGCT | GCATTGAAGT | CCGGCATGGA | GGCGACACCG | ATC | 233 |
| ATG AAT CAG CAC CCC ACC GAT CTT TCC CCG TTC GAT CCC GGC CGC AAG | | | | | | 281 |
| Met Asn Gln His Pro Thr Asp Leu Ser Pro Phe Asp Pro Gly Arg Lys | | | | | | |
| 5 | 10 | 15 | | | | |
| TGC GTC CGC GTG ACC GGC ACG AAC GCG CGC GGC TTC GTC GAA TTC GAG | | | | | | 329 |
| Cys Val Arg Val Thr Gly Thr Asn Ala Arg Gly Phe Val Glu Phe Glu | | | | | | |
| 20 | 25 | 30 | | | | |
| CTG TCG ATC GGC GGC GCG CCG GAA CTG TGC GTC GAG CTG ACG TTG TCT | | | | | | 377 |
| Leu Ser Ile Gly Gly Ala Pro Glu Leu Cys Val Glu Leu Thr Leu Ser | | | | | | |
| 35 | 40 | 45 | | | | |
| CCT GCC GCC TTC GAT GCG TTC TGC CGC GAA CAG CAG GTC ACG CGG CTC | | | | | | 425 |
| Pro Ala Ala Phe Asp Ala Phe Cys Arg Glu Gln Gln Val Thr Arg Leu | | | | | | |
| 50 | 55 | 60 | | | | |
| GAC GTC GAA GCG AAC CCA | | | | | | 443 |
| Asp Val Glu Ala Asn Pro | | | | | | |
| 65 | 70 | | | | | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| TGACCTTGAGGAGCAAGAA | | | 462 |
| GTG ACC ATC GAG CTG AAG ACA GTC GAC ATC AAG CCG CTC CGG CAC ACC | | | 510 |
| Met Thr Ile Glu Leu Lys Thr Val Asp Ile Lys Pro Leu Arg His Thr | | | |
| 5 | 10 | 15 | |
| TTT GCG CAT GTC GCG CAG AAC ATC GGC GGC GAC AAG ACG GCG ACG CGC | | | 558 |
| Phe Ala His Val Ala Gln Asn Ile Gly Gly Asp Lys Thr Ala Thr Arg | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| TAC CAG GAA GGC ATG ATG GGC GCG CAG CCC CAG GAG AAC TTC CAT TAC | | | 606 |
| Tyr Gln Glu Gly Met Met Gly Ala Gln Pro Gln Glu Asn Phe His Tyr | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| CGG CCG ACC TGG GAC CCG GAC TAC GAG ATC TTC GAT CCG TCG CGC TCG | | | 654 |
| Arg Pro Thr Trp Asp Pro Asp Tyr Glu Ile Phe Asp Pro Ser Arg Ser | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| GGC ATC CGG ATG GCG AAC TGG TAC GCG TTG AAG GAT CCG CGC CAG TTC | | | 702 |
| Ala Ile Arg Met Ala Asn Trp Tyr Ala Leu Lys Asp Pro Arg Gln Phe | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| TAC TAC GCG TCG TGG GCG ACC ACG CGG GCG CGC CAG CAG GAT GCG ATG | | | 750 |
| Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Thr Thr Arg Ala Arg Gln Gln Asp Ala Met | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| GAG TCG AAC TTC GAG TTC GTC GAA TCG CGC CGG ATG ATC GGC CTG ATG | | | 798 |
| Glu Ser Asn Phe Glu Phe Val Glu Ser Arg Arg Met Ile Gly Leu Met | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| CGC GAC GAC GTG GCC GCG CGG GCG CTC GAC GTG CTG GTG CCG CTG CGC | | | 846 |
| Arg Asp Asp Val Ala Ala Arg Ala Leu Asp Val Leu Val Pro Leu Arg | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| CAC GCC GCG TGG GGC GCG AAC ATG AAC AAC GCG CAG ATC TGC GCG CTC | | | 894 |
| His Ala Ala Trp Gly Ala Asn Met Asn Asn Ala Gln Ile Cys Ala Leu | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| GGC TAC GGC ACG GTG TTC ACC GCG CCC GCG ATG TTC CAT GCG ATG GAC | | | 942 |

Gly Tyr Gly Thr Val Phe Thr Ala Pro Ala Met Phe His Ala Met Asp
 145 150 155 160
 AAC CTC GGC GTC GCG CAA TAC CTC ACG CGT CTC GCG CTC GCG ATG GCC 990
 Asn Leu Gly Val Ala Gln Tyr Leu Thr Arg Leu Ala Leu Ala Met Ala
 165 170 175
 GAG CCC GAC GTG CTG GAG GCG GCC AAG GCG ACC TGG ACC CGC GAC GCC 1038
 Glu Pro Asp Val Leu Glu Ala Ala Lys Ala Thr Trp Thr Arg Asp Ala
 180 185 190
 GCC TGG CAG CCG CTG CGC CGC TAC GTC GAG GAC ACG CTG GTC GTC GCC 1086
 Ala Trp Gln Pro Leu Arg Arg Tyr Val Glu Asp Thr Leu Val Val Ala
 195 200 205
 GAT CCG GTC GAG CTG TTC ATC GCG CAG AAC CTC GCG CTC GAC GGC CTG 1134
 Asp Pro Val Glu Leu Phe Ile Ala Gln Asn Leu Ala Leu Asp Gly Leu
 210 215 220
 CTG TAT CCG CTC GTC TAC GAC CGC TTC GTC GAC GAA CGG ATC GCG CTC 1182
 Leu Tyr Pro Leu Val Tyr Asp Arg Phe Val Asp Glu Arg Ile Ala Leu
 225 230 235 240
 GAA GGC GGC TCG GCA GTC GCG ATG CTG ACC GCG TTC ATG CCC GAA TGG 1230
 Glu Gly Gly Ser Ala Val Ala Met Leu Thr Ala Phe Met Pro Glu Trp
 245 250 255
 CAC ACC GAG TCG AAC CGC TGG ATC GAC GCG GTC GTG AAG ACG ATG GCC 1278
 His Thr Glu Ser Asn Arg Trp Ile Asp Ala Val Val Lys Thr Met Ala
 260 265 270
 GCC GAA TCC GAC GAC AAC CGC GCG CTG CTC GCC CGC TGG ACA CGC GAC 1326
 Ala Glu Ser Asp Asp Asn Arg Ala Leu Leu Ala Arg Trp Thr Arg Asp
 275 280 285
 TGG TCC GCG CGC GCC GAG GCG GCA CTG GCA CCG GTG GCG GCA CGC GCG 1374
 Trp Ser Ala Arg Ala Glu Ala Ala Leu Ala Pro Val Ala Ala Arg Ala
 290 295 300

CTG CAG GAT GCC GGG CGC GCG GCG CTC GAC GAA GTG CGC GAG CAG TTC 1422
 Leu Gln Asp Ala Gly Arg Ala Ala Leu Asp Glu Val Arg Glu Gln Phe
 305 310 315 320
 CAC GCA CGC GCG GCC AGG CTC GGC ATC GCG CTC 1455
 His Ala Arg Ala Ala Arg Leu Gly Ile Ala Leu
 325 330
 TGACGACGGG AATCCTCCCT TAACCCAAGG AATGCCAGC 1494
 ATG TCC AAC GTA TTC ATC GCC TTT CAG GCC AAT GAG GAC TCC AGA CCG 1542
 Met Ser Asn Val Phe Ile Ala Phe Gln Ala Asn Glu Asp Ser Arg Pro
 5 10 15
 ATC GTG GAT GCG ATC GTC GCC GAC AAC CCG CGC GCG GTG GTG GTC GAG 1590
 Ile Val Asp Ala Ile Val Ala Asp Asn Pro Arg Ala Val Val Val Glu
 20 25 30
 TCG CCC GGC ATG GTC AAG ATC GAC GCG CCG GAC CGG CTG ACG ATC CGC 1638
 Ser Pro Gly Met Val Lys Ile Asp Ala Pro Asp Arg Leu Thr Ile Arg
 35 40 45
 CGC GAA ACG ATC GAG GAA CTG ACC GGC ACG CGC TTC GAC CTG CAG CAG 1686
 Arg Glu Thr Ile Glu Glu Leu Thr Gly Thr Arg Phe Asp Leu Gln Gln
 50 55 60
 CTC CAG GTC AAC CTG ATC ACG CTG TCA GGC CAC ATC GAC GAG GAC GAC 1734
 Leu Gln Val Asn Leu Ile Thr Leu Ser Gly His Ile Asp Glu Asp Asp
 65 70 75 80
 GAC GAG TTC ACG CTG AGC TGG TCG CAC 1761
 Asp Glu Phe Thr Leu Ser Trp Ser His
 85
 TGAACGCCGC GCCACGCGCA CCGACAACAC CGGAGACACG A 1802
 ATG GAC ACG CCA ACG CTC AAG AAA AAA CTC GGC CTG AAG GAC CGC TAC 1850
 Met Asp Thr Pro Thr Leu Lys Lys Lys Leu Gly Leu Lys Asp Arg Tyr
 5 10 15

GCG GCA ATG ACG CGC GGC CTC GGC TGG GAG ACG ACC TAC CAG CCG ATG 1898
 Ala Ala Met Thr Arg Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Tyr Gln Pro Met
 20 25 30

GAC AAG GTC TTC CCG TAC GAC CGC TAC GAG GGC ATC AAG ATC CAC GAC 1946
 Asp Lys Val Phe Pro Tyr Asp Arg Tyr Glu Gly Ile Lys Ile His Asp
 35 40 45

TGG GAC AAG TGG GTC GAC CCG TTC CGC CTG ACG ATG GAT GCG TAC TGG 1994
 Trp Asp Lys Trp Val Asp Pro Phe Arg Leu Thr Met Asp Ala Tyr Trp
 50 55 60

AAA TAC CAG GGC GAG AAG GAA AAG AAG CTG TAC GCG GTG ATC GAC GCG 2042
 Lys Tyr Gln Gly Glu Lys Glu Lys Lys Leu Tyr Ala Val Ile Asp Ala
 65 70 75 80

TTC ACG CAG AAC AAC GCG TTC CTC GGC GTG AGC GAC GCC CGC TAC ATC 2090
 Phe Thr Gln Asn Asn Ala Phe Leu Gly Val Ser Asp Ala Arg Tyr Ile
 85 90 95

AAC GCG CTG AAG CTG TTC CTC CAG GGC GTG ACG CCG CTC GAA TAC CTC 2138
 Asn Ala Leu Lys Leu Phe Leu Gln Gly Val Thr Pro Leu Glu Tyr Leu
 100 105 110

GCG CAC CGC GGC TTC GCG CAT GTC GGC CGG CAC TTC ACC GGC GAG GGC 2186
 Ala His Arg Gly Phe Ala His Val Gly Arg His Phe Thr Gly Glu Gly
 115 120 125

GCG CGC ATC GCG TGC CAG ATG CAG TCG ATC GAC GAG CTG CGG CAC TAC 2234
 Ala Arg Ile Ala Cys Gln Met Gln Ser Ile Asp Glu Leu Arg His Tyr
 130 135 140

CAG ACC GAA ACG CAT GCG ATG TCG ACG TAC AAC AAG TTC TTC AAC GGG 2282
 Gln Thr Glu Thr His Ala Met Ser Thr Tyr Asn Lys Phe Phe Asn Gly
 145 150 155 160

TTC CAT CAC TCG AAC CAG TGG TTC GAC CGC GTG TGG TAC CTG TCG GTG 2330
 Phe His His Ser Asn Gln Trp Phe Asp Arg Val Trp Tyr Leu Ser Val

| | | |
|--|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 |
| CCG AAG TCG TTC TTC GAG GAC GCG TAT TCG TCG GGG CCG TTC GAG TTC 2378 | | |
| Pro Lys Ser Phe Phe Glu Asp Ala Tyr Ser Ser Gly Pro Phe Glu Phe | | |
| 180 | 185 | 190 |
| CTG ACC GCG GTC AGC TTC TCG TTC GAA TAC GTG CTG ACG AAC CTG CTG 2426 | | |
| Leu Thr Ala Val Ser Phe Ser Phe Glu Tyr Val Leu Thr Asn Leu Leu | | |
| 195 | 200 | 205 |
| TTC GTG CCG TTC ATG TCG GGC GCC TAC AAC GGT GAC ATG TCG ACC 2474 | | |
| Phe Val Pro Phe Met Ser Gly Ala Ala Tyr Asn Gly Asp Met Ser Thr | | |
| 210 | 215 | 220 |
| GTC ACG TTC GGC TTC TCC GCG CAG TCG GAC GAA TCG CGT CAC ATG ACG 2522 | | |
| Val Thr Phe Gly Phe Ser Ala Gln Ser Asp Glu Ser Arg His Met Thr | | |
| 225 | 230 | 235 |
| CTC GGC ATC GAA TGC ATC AAG TTC CTG CTC GAA CAG GAC CCG GAC AAC 2570 | | |
| Leu Gly Ile Glu Cys Ile Lys Phe Leu Leu Glu Gln Asp Pro Asp Asn | | |
| 245 | 250 | 255 |
| GTG CCG ATC GTG CAG CGC TGG ATC GAC AAG TGG TTC TGG CGC GGC TAC 2618 | | |
| Val Pro Ile Val Gln Arg Trp Ile Asp Lys Trp Phe Trp Arg Gly Tyr | | |
| 260 | 265 | 270 |
| CGG CTG CTG ACG CTG GTC GCG ATG ATG ATG GAC TAC ATG CAG CCC AAG 2666 | | |
| Arg Leu Leu Thr Leu Val Ala Met Met Met Asp Tyr Met Gln Pro Lys | | |
| 275 | 280 | 285 |
| CGC GTG ATG AGC TGG CGC GAG TCG TGG GAG ATG TAC GCC GAG CAG AAC 2714 | | |
| Arg Val Met Ser Trp Arg Glu Ser Trp Glu Met Tyr Ala Glu Gln Asn | | |
| 290 | 295 | 300 |
| GGC GGC GCG CTG TTC AAG GAT CTC GCG CGC TAC GGC ATT CGC GAG CCG 2762 | | |
| Gly Gly Ala Leu Phe Lys Asp Leu Ala Arg Tyr Gly Ile Arg Glu Pro | | |
| 305 | 310 | 315 |
| AAG GGC TGG CAG GAC GCC TGC GAA GGC AAG GAT CAC ATC AGC CAC CAG 2810 | | |

Lys Gly Trp Gln Asp Ala Cys Glu Gly Lys Asp His Ile Ser His Gln
 325 330 335
 GCG TGG TCG ACG TTC TAC GGC TTC AAC GCG GCC TCG GCG TTC CAC ACC 2858
 Ala Trp Ser Thr Phe Tyr Gly Phe Asn Ala Ala Ser Ala Phe His Thr
 340 345 350
 TGG GTG CCG ACC GAA GAC GAA ATG GGC TGG CTG TCG GCG AAG TAT CCC 2906
 Trp Val Pro Thr Glu Asp Glu Met Gly Trp Leu Ser Ala Lys Tyr Pro
 355 360 365
 GAC TCG TTC GAC CGC TAC TAC CGC CCG CGC TTC GAT CAC TGG GGC GAG 2954
 Asp Ser Phe Asp Arg Tyr Tyr Arg Pro Arg Phe Asp His Trp Gly Glu
 370 375 380
 CAG GCC AGG GCC GGC AAC CGC TTC TAC ATG AAG ACG CTG CCG ATG CTG 3002
 Gln Ala Arg Ala Gly Asn Arg Phe Tyr Met Lys Thr Leu Pro Met Leu
 385 390 395 400
 TGC CAG ACG TGC CAG ATC CCG ATG CTG TTC ACC GAG CCG GGC AAC CCG 3050
 Cys Gln Thr Cys Gln Ile Pro Met Leu Phe Thr Glu Pro Gly Asn Pro
 405 410 415
 ACG AAG ATC GGC GCG CGC GAA TCG AAC TAC CTC GGC AAC AAG TTC CAC 3098
 Thr Lys Ile Gly Ala Arg Glu Ser Asn Tyr Leu Gly Asn Lys Phe His
 420 425 430
 TTC TGC AGC GAC CAC TGC AAG GAC ATC TTC GAT CAC GAG CCG CAG AAA 3146
 Phe Cys Ser Asp His Cys Lys Asp Ile Phe Asp His Glu Pro Gln Lys
 435 440 445
 TAC GTG CAG GCG TGG CTG CCG GTG CAC CAG ATC CAT CAG GGC AAC TGC 3194
 Tyr Val Gln Ala Trp Leu Pro Val His Gln Ile His Gln Gly Asn Cys
 450 455 460
 TTC CCG CCC GAT GCG GAC CCG GGC GCG GAG GGC TTC GAT CCG CTC GCC 3242
 Phe Pro Pro Asp Ala Asp Pro Gly Ala Glu Gly Phe Asp Pro Leu Ala
 465 470 475 480

GCG GTG CTC GAC TAC TAC GCG GTG ACG ATG GGC CGC GAC AAC CTC GAT 3290
 Ala Val Leu Asp Tyr Tyr Ala Val Thr Met Gly Arg Asp Asn Leu Asp
 485 490 495
 TTC GAC GGC TCG GAA GAC CAG AAG AAC TTC GCG GCG TGG CGC GGC CAG 3338
 Phe Asp Gly Ser Glu Asp Gln Lys Asn Phe Ala Ala Trp Arg Gly Gln
 500 505 510
 GCC ACG CGC AAC 3350
 Ala Thr Arg Asn
 515
 TGACCCGCAA CGACAAGCAA TCTTGACGAG GGCCCGCGAA GCGCCGATGC GCGAACGGGG 3410
 GCCGACAGGA GACAAAC 3427
 ATG GCC GTC ATC GCG CTC AAA CCC TAC GAC TTC CCG GTG AAG GAT GCC 3475
 Met Ala Val Ile Ala Leu Lys Pro Tyr Asp Phe Pro Val Lys Asp Ala
 5 10 15
 GTC GAG AAG TTT CCG GCG CCG CTG CTC TAC GTG TGC TGG GAA AAC CAT 3523
 Val Glu Lys Phe Pro Ala Pro Leu Leu Tyr Val Cys Trp Glu Asn His
 20 25 30
 CTG ATG TTC CCG GCG CCG TTC TGC CTG CCG CTG CCG CCC GAC ATG CCG 3571
 Leu Met Phe Pro Ala Pro Phe Cys Leu Pro Leu Pro Pro Asp Met Pro
 35 40 45
 TTC GGC GCG CTG GCC GGC GAC GTG CTG CCG CCC GTC TAC GGC TAT CAC 3619
 Phe Gly Ala Leu Ala Gly Asp Val Leu Pro Pro Val Tyr Gly Tyr His
 50 55 60
 CCC GAC TTC GCG AAG ATC GAC TGG GAT CGC GTC GAG TGG TTC CGG TCG 3667
 Pro Asp Phe Ala Lys Ile Asp Trp Asp Arg Val Glu Trp Phe Arg Ser
 65 70 75 80
 GGC GAG CCG TGG GCG CCG GAC CCG GCG AAG AGC CTG GCC GGC AAC GGC 3715
 Gly Glu Pro Trp Ala Pro Asp Pro Ala Lys Ser Leu Ala Gly Asn Gly
 85 90 95

CTC GGG CAC AAG GAC CTG ATC AGC TTC CGC ACG CCC GGC CTC GAC GGC 3763
 Leu Gly His Lys Asp Leu Ile Ser Phe Arg Thr Pro Gly Leu Asp Gly
 100 105 110
 CTC GGC GGC GCG AGC TTC 3781
 Leu Gly Gly Ala Ser Phe
 115
 TGACCGCCAC GCGGACCGAGC GAACCATC 3809
 ATG AGC CAC CAA CTT ACC ATC GAG CCG CTG GGC GTC ACG ATC GAG GTC 3857
 Met Ser His Gln Leu Thr Ile Glu Pro Leu Gly Val Thr Ile Glu Val
 5 10 15
 GAG GAA GGA CAG ACG ATG CTC GAT GCC GCG CTG CGC CAG GGC ATC TAC 3905
 Glu Glu Gly Gln Thr Met Leu Asp Ala Ala Leu Arg Gln Gly Ile Tyr
 20 25 30
 ATT CCG CAC GCG TGC TGT CAC GGG CTG TGC GGC ACC TGC AAG GTC GCC 3953
 Ile Pro His Ala Cys Cys His Gly Leu Cys Gly Thr Cys Lys Val Ala
 35 40 45
 GTG CTC GAC GGC GAG ACC GAT CCC GGC GAT GCG AAC CCG TTC GCG CTG 4001
 Val Leu Asp Gly Glu Thr Asp Pro Gly Asp Ala Asn Pro Phe Ala Leu
 50 55 60
 ATG GAT TTC GAG CGC GAG GAA GGC AAG GCG CTC GCG TGC TGC GCG ACG 4049
 Met Asp Phe Glu Arg Glu Glu Gly Lys Ala Leu Ala Cys Cys Ala Thr
 65 70 75 80
 CTG CAG GCC GAC ACC GTG ATC GAG GCC GAC GTC GAC GAG CCG GAT 4097
 Leu Gln Ala Asp Thr Val Ile Glu Ala Asp Val Asp Glu Glu Pro Asp
 85 90 95
 GCG GAA ATC ATC CCG GTC AGG GAC TTC GCG GCC GAC GTC ACG CGC ATC 4145
 Ala Glu Ile Ile Pro Val Arg Asp Phe Ala Ala Asp Val Thr Arg Ile
 100 105 110
 GAA CAG CTC ACG CCG ACC ATC AAG TCG ATC CGC CTG AAG CTG TCG CAG 4193

Glu Gln Leu Thr Pro Thr Ile Lys Ser Ile Arg Leu Lys Leu Ser Gln
 115 120 125
 CCG ATC CGC TTC CAG GCG GGC CAG TAC GTG CAG CTC GAG ATT CCC GGC 4241
 Pro Ile Arg Phe Gln Ala Gly Gln Tyr Val Gln Leu Glu Ile Pro Gly
 130 135 140
 CTC GGG CAG AGC CGC GCG TTC TCG ATC GCG AAC GCG CCG GCC GAC GTC 4289
 Leu Gly Gln Ser Arg Ala Phe Ser Ile Ala Asn Ala Pro Ala Asp Val
 145 150 155 160
 GCG GCC ACC GGC GAG ATC GAA CTG AAC GTG CGG CAG GTG CCG GGC GGG 4337
 Ala Ala Thr Gly Glu Ile Glu Leu Asn Val Arg Gln Val Pro Gly Gly
 165 170 175
 CTC GGC ACG GGC TAC CTG CAC GAG CAA CTG GCG ACG GGC GAG CGC GTG 4385
 Leu Gly Thr Gly Tyr Leu His Glu Gln Leu Ala Thr Gly Glu Arg Val
 180 185 190
 CGC CTG TCG GGC CCG TAC GGC CGC TTC TTC GTG CGT CGC TCG GCC GCG 4433
 Arg Leu Ser Gly Pro Tyr Gly Arg Phe Phe Val Arg Arg Ser Ala Ala
 195 200 205
 CGG CCG ATG ATC TTC ATG GCC GGC GGG TCG GGG CTG TCG AGC CCG CGC 4481
 Arg Pro Met Ile Phe Met Ala Gly Gly Ser Gly Leu Ser Ser Pro Arg
 210 215 220
 TCG ATG ATC GCG GAC CTG CTC GCA AGC GGC GTC ACC GCG CCG ATC ACG 4529
 Ser Met Ile Ala Asp Leu Leu Ala Ser Gly Val Thr Ala Pro Ile Thr
 225 230 235 240
 CTG GTC TAC GGT CAG CGC AGC GCG CAG GAG CTC TAC TAC CAC GAC GAA 4577
 Leu Val Tyr Gly Gln Arg Ser Ala Gln Glu Leu Tyr Tyr His Asp Glu
 245 250 255
 TTC CGC GCG CTG GCC GAA CGC CAT CCG AAC TTC ACG TAC GTG CCG GCG 4625
 Phe Arg Ala Leu Ala Glu Arg His Pro Asn Phe Thr Tyr Val Pro Ala
 260 265 270

CTG TCC GAA GGC GCA CCG CAC GCG GGC GGC GAC GTC GCG CAA GGG TTC 4673
 Leu Ser Glu Gly Ala Pro His Ala Gly Gly Asp Val Ala Gln Gly Phe
 275 280 285
 GTG CAC GAC GTC GCG AAG GCA CAT TTC GGC GGC GAC TTC TCC GGG CAC 4721
 Val His Asp Val Ala Lys Ala His Phe Gly Gly Asp Phe Ser Gly His
 290 295 300
 CAG GCG TAC CTG TGC GGG CCG CCC GCG ATG ATC GAC GCG TGC ATC ACG 4769
 Gln Ala Tyr Leu Cys Gly Pro Pro Ala Met Ile Asp Ala Cys Ile Thr
 305 310 315 320
 ACG CTG ATG CAG GGG CGC CTG TTC GAG CGC GAC ATC TAT CAC GAG AAG 4817
 Thr Leu Met Gln Gly Arg Leu Phe Glu Arg Asp Ile Tyr His Glu Lys
 325 330 335
 TTC ATC TCG GCG GCC GAC GCG CAA CAG ACG CGC AGC CCG CTG TTC CGG 4865
 Phe Ile Ser Ala Ala Asp Ala Gln Gln Thr Arg Ser Pro Leu Phe Arg
 340 345 350
 CGG GTG 4871
 Arg Val
 TGAC 4875
 ATG GAC GCG GGC CGC GTA TGC GGG ACG GTC ACG ATC GCG CAG ACC GAC 4923
 Met Asp Ala Gly Arg Val Cys Gly Thr Val Thr Ile Ala Gln Thr Asp
 5 10 15
 GAG CGC TAT GCG TGC GTG TCC GGC GAG TCG CTG CTG GCC GGC ATG GCG 4971
 Glu Arg Tyr Ala Cys Val Ser Gly Glu Ser Leu Leu Ala Gly Met Ala
 20 25 30
 AAA CTC GGC CGG CGC GGC ATT CCG GTC GGC TGC CTG AAC GGC GGG TGC 5019
 Lys Leu Gly Arg Arg Gly Ile Pro Val Gly Cys Leu Asn Gly Gly Cys
 35 40 45
 GGC GTG TGC AAG GTG CGC GTG CTG CGC GGT GCG GTG CGC AAG CTC GGG 5067
 Gly Val Cys Lys Val Arg Val Leu Arg Gly Ala Val Arg Lys Leu Gly

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 50 | 55 | 60 | |
| CCG ATC AGC CGT GCC CAT GTG AGC GCG GAA GAA GAG AAC GAC GGC TAC 5115 | | | |
| Pro Ile Ser Arg Ala His Val Ser Ala Glu Glu Glu Asn Asp Gly Tyr | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| GCG CTT GCG TGC CGC GTC GTG CCG GAC GGC GAC GTC GAA CTC GAA GTG 5163 | | | |
| Ala Leu Ala Cys Arg Val Val Pro Asp Gly Asp Val Glu Leu Glu Val | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| GCC GGC CGG CTC AGG AAG CCG TTC TTC TGC GGC ATG GCA TGT GCC GGC 5211 | | | |
| Ala Gly Arg Leu Arg Lys Pro Phe Phe Cys Gly Met Ala Cys Ala Gly | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| ACG GCG GCG ATC AAC AAG | | | 5229 |
| Thr Ala Ala Ile Asn Lys | | | |
| 115 | | | |
| TAACCAGGAG GAGACTCACCC ATGGGTGTGA TCGGTATTGG TCATGTCAGT CTGAAGGTGA 5289 | | | |
| TGGACATGGA AGCGGCGCTG CGTCATTACG TACGCGTGCT CGGCATGCAG GAAACGATGC 5349 | | | |
| GGCACGCCGC GGGCAACGTC TACCTGAAAT GCTGGGACGA ATGGGACAAG TATTCGCTGA 5409 | | | |
| TCCTGTCGCC GTCCGATCAG GCGGGGCTCA AGCATGCCGC CTACAAGGTC GAGCACGACG 5469 | | | |
| CCGATCTGGA TCGCCTGCAG CAGCGCATCG AAGCGTACGG GATCGCGACC GAGATGCTGC 5529 | | | |
| CCGAAGGCCGC GCTGCCGGCG GTCGGCCGCC AACTGCGGTT CCTGCTGCCG AGCGGCCATG 5589 | | | |
| AACTGCGGCT GTTCGCGAAG AAGGCGCTGG TGGGCACCGC GGTCGGCTCG CTGAACCCCG 5649 | | | |
| ATCCGTGGCC CGACGACATT CCGGGCTCGG CCGTGCACTG GCTCGACCCAC TGCCTGCTGA 5709 | | | |
| TGTGCGAACT GAACCCGGAG GCCGGCGTGA ACCCGCGTCGA GGAGAACACG CGCTTCATGG 5769 | | | |
| CCGAGTGTCT CGACTTCCAT CTGGCCGAGC AGGTGATGGT CGGCCCGGGC AACACGATC 5828 | | | |

【0096】

配列番号：2

配列の長さ：76

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：T o m K ポリペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Ala | Thr | Pro | Ile | Met | Asn | Gln | His | Pro | Thr | Asp | Leu | Ser | Pro |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| Phe | Asp | Pro | Gly | Arg | Lys | Cys | Val | Arg | Val | Thr | Gly | Thr | Asn | Ala | Arg |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| Gly | Phe | Val | Glu | Phe | Glu | Leu | Ser | Ile | Gly | Gly | Ala | Pro | Glu | Leu | Cys |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | 45 |
| Val | Glu | Leu | Thr | Leu | Ser | Pro | Ala | Ala | Phe | Asp | Ala | Phe | Cys | Arg | Glu |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | 60 |
| Gln | Gln | Val | Thr | Arg | Leu | Asp | Val | Glu | Ala | Asn | Pro | | | | |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | 75 |

【0097】

配列番号：3

配列の長さ：355

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：T o m L ポリペプチド

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Ser | Ala | Ala | Asn | Ser | Arg | Ser | Arg | Gly | Ser | Thr | Ser | Lys | Arg |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | 15 |
| Thr | His | Asp | Leu | Glu | Glu | Gln | Glu | Val | Thr | Ile | Glu | Leu | Lys | Thr | Val |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | 30 |
| Asp | Ile | Lys | Pro | Leu | Arg | His | Thr | Phe | Ala | His | Val | Ala | Gln | Asn | Ile |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | 45 |
| Gly | Gly | Asp | Lys | Thr | Ala | Thr | Arg | Tyr | Gln | Glu | Gly | Met | Met | Gly | Ala |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | 60 |
| Gln | Pro | Gln | Glu | Asn | Phe | His | Tyr | Arg | Pro | Thr | Trp | Asp | Pro | Asp | Tyr |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Glu Ile Phe Asp Pro Ser Arg Ser Ala Ile Arg Met Ala Asn Trp Tyr | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Ala Leu Lys Asp Pro Arg Gln Phe Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Thr Thr | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Arg Ala Arg Gln Gln Asp Ala Met Glu Ser Asn Phe Glu Phe Val Glu | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Ser Arg Arg Met Ile Gly Leu Met Arg Asp Asp Val Ala Ala Arg Ala | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Leu Asp Val Leu Val Pro Leu Arg His Ala Ala Trp Gly Ala Asn Met | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Asn Asn Ala Gln Ile Cys Ala Leu Gly Tyr Gly Thr Val Phe Thr Ala | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Pro Ala Met Phe His Ala Met Asp Asn Leu Gly Val Ala Gln Tyr Leu | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Thr Arg Leu Ala Leu Ala Met Ala Glu Pro Asp Val Leu Glu Ala Ala | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Lys Ala Thr Trp Thr Arg Asp Ala Ala Trp Gln Pro Leu Arg Arg Tyr | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Val Glu Asp Thr Leu Val Val Ala Asp Pro Val Glu Leu Phe Ile Ala | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gln Asn Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Tyr Pro Leu Val Tyr Asp Arg | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Phe Val Asp Glu Arg Ile Ala Leu Glu Gly Gly Ser Ala Val Ala Met | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Leu Thr Ala Phe Met Pro Glu Trp His Thr Glu Ser Asn Arg Trp Ile | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Asp Ala Val Val Lys Thr Met Ala Ala Glu Ser Asp Asp Asn Arg Ala | | | |
| 290 | 295 | 300 | |

Leu Leu Ala Arg Trp Thr Arg Asp Trp Ser Ala Arg Ala Glu Ala Ala
 305 310 315 320

Leu Ala Pro Val Ala Ala Arg Ala Leu Gln Asp Ala Gly Arg Ala Ala
 325 330 335

Leu Asp Glu Val Arg Glu Gln Phe His Ala Arg Ala Ala Arg Leu Gly
 340 345 350

Ile Ala Leu

355

【0098】

配列番号：4

配列の長さ：89

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：T o mMポリペプチド

配列：

Met Ser Asn Val Phe Ile Ala Phe Gln Ala Asn Glu Asp Ser Arg Pro
 5 10 15

Ile Val Asp Ala Ile Val Ala Asp Asn Pro Arg Ala Val Val Val Glu
 20 25 30

Ser Pro Gly Met Val Lys Ile Asp Ala Pro Asp Arg Leu Thr Ile Arg
 35 40 45

Arg Glu Thr Ile Glu Glu Leu Thr Gly Thr Arg Phe Asp Leu Gln Gln
 50 55 60

Leu Gln Val Asn Leu Ile Thr Leu Ser Gly His Ile Asp Glu Asp Asp
 65 70 75 80

Asp Glu Phe Thr Leu Ser Trp Ser His
 85

【0099】

配列番号 5

配列の長さ： 516

配列の型： アミノ酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： T o m N ポリペプチド

配列：

Met Asp Thr Pro Thr Leu Lys Lys Lys Leu Gly Leu Lys Asp Arg Tyr

5 10 15

Ala Ala Met Thr Arg Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Tyr Gln Pro Met

20 25 30

Asp Lys Val Phe Pro Tyr Asp Arg Tyr Glu Gly Ile Lys Ile His Asp

35 40 45

Trp Asp Lys Trp Val Asp Pro Phe Arg Leu Thr Met Asp Ala Tyr Trp

50 55 60

Lys Tyr Gln Gly Glu Lys Glu Lys Lys Leu Tyr Ala Val Ile Asp Ala

65 70 75 80

Phe Thr Gln Asn Asn Ala Phe Leu Gly Val Ser Asp Ala Arg Tyr Ile

85 90 95

Asn Ala Leu Lys Leu Phe Leu Gln Gly Val Thr Pro Leu Glu Tyr Leu

100 105 110

Ala His Arg Gly Phe Ala His Val Gly Arg His Phe Thr Gly Glu Gly

115 120 125

Ala Arg Ile Ala Cys Gln Met Gln Ser Ile Asp Glu Leu Arg His Tyr

130 135 140

Gln Thr Glu Thr His Ala Met Ser Thr Tyr Asn Lys Phe Phe Asn Gly

145 150 155 160

Phe His His Ser Asn Gln Trp Phe Asp Arg Val Trp Tyr Leu Ser Val

165 170 175

Pro Lys Ser Phe Phe Glu Asp Ala Tyr Ser Ser Gly Pro Phe Glu Phe
 180 185 190
 Leu Thr Ala Val Ser Phe Ser Phe Glu Tyr Val Leu Thr Asn Leu Leu
 195 200 205
 Phe Val Pro Phe Met Ser Gly Ala Ala Tyr Asn Gly Asp Met Ser Thr
 210 215 220
 Val Thr Phe Gly Phe Ser Ala Gln Ser Asp Glu Ser Arg His Met Thr
 225 230 235 240
 Leu Gly Ile Glu Cys Ile Lys Phe Leu Leu Glu Gln Asp Pro Asp Asn
 245 250 255
 Val Pro Ile Val Gln Arg Trp Ile Asp Lys Trp Phe Trp Arg Gly Tyr
 260 265 270
 Arg Leu Leu Thr Leu Val Ala Met Met Met Asp Tyr Met Gln Pro Lys
 275 280 285
 Arg Val Met Ser Trp Arg Glu Ser Trp Glu Met Tyr Ala Glu Gln Asn
 290 295 300
 Gly Gly Ala Leu Phe Lys Asp Leu Ala Arg Tyr Gly Ile Arg Glu Pro
 305 310 315 320
 Lys Gly Trp Gln Asp Ala Cys Glu Gly Lys Asp His Ile Ser His Gln
 325 330 335
 Ala Trp Ser Thr Phe Tyr Gly Phe Asn Ala Ala Ser Ala Phe His Thr
 340 345 350
 Trp Val Pro Thr Glu Asp Glu Met Gly Trp Leu Ser Ala Lys Tyr Pro
 355 360 365
 Asp Ser Phe Asp Arg Tyr Tyr Arg Pro Arg Phe Asp His Trp Gly Glu
 370 375 380
 Gln Ala Arg Ala Gly Asn Arg Phe Tyr Met Lys Thr Leu Pro Met Leu
 385 390 395 400
 Cys Gln Thr Cys Gln Ile Pro Met Leu Phe Thr Glu Pro Gly Asn Pro

| | | |
|---|-----|-----|
| 405 | 410 | 415 |
| Thr Lys Ile Gly Ala Arg Glu Ser Asn Tyr Leu Gly Asn Lys Phe His | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Phe Cys Ser Asp His Cys Lys Asp Ile Phe Asp His Glu Pro Gln Lys | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Tyr Val Gln Ala Trp Leu Pro Val His Gln Ile His Gln Gly Asn Cys | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Phe Pro Pro Asp Ala Asp Pro Gly Ala Glu Gly Phe Asp Pro Leu Ala | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Ala Val Leu Asp Tyr Tyr Ala Val Thr Met Gly Arg Asp Asn Leu Asp | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Phe Asp Gly Ser Glu Asp Gln Lys Asn Phe Ala Ala Trp Arg Gly Gln | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Ala Thr Arg Asn | | |
| 515 | | |

【0100】

配列番号：6

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：TomOポリペプチド

配列：

Met Ala Val Ile Ala Leu Lys Pro Tyr Asp Phe Pro Val Lys Asp Ala

5 10 15

Val Glu Lys Phe Pro Ala Pro Leu Leu Tyr Val Cys Trp Glu Asn His

20 25 30

Leu Met Phe Pro Ala Pro Phe Cys Leu Pro Leu Pro Pro Asp Met Pro

35 40 45

Phe Gly Ala Leu Ala Gly Asp Val Leu Pro Pro Val Tyr Gly Tyr His
 50 55 60
 Pro Asp Phe Ala Lys Ile Asp Trp Asp Arg Val Glu Trp Phe Arg Ser
 65 70 75 80
 Gly Glu Pro Trp Ala Pro Asp Pro Ala Lys Ser Leu Ala Gly Asn Gly
 85 90 95
 Leu Gly His Lys Asp Leu Ile Ser Phe Arg Thr Pro Gly Leu Asp Gly
 100 105 110
 Leu Gly Gly Ala Ser Phe
 115

【0101】

配列番号：7

配列の長さ：352

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：T o m P ポリペプチド

配列：

Met Ser His Gln Leu Thr Ile Glu Pro Leu Gly Val Thr Ile Glu Val
 5 10 15
 Glu Glu Gly Gln Thr Met Leu Asp Ala Ala Leu Arg Gin Gly Ile Tyr
 20 25 30
 Ile Pro His Ala Cys Cys His Gly Leu Cys Gly Thr Cys Lys Val Ala
 35 40 45
 Val Leu Asp Gly Glu Thr Asp Pro Gly Asp Ala Asn Pro Phe Ala Leu
 50 55 60
 Met Asp Phe Glu Arg Glu Glu Gly Lys Ala Leu Ala Cys Cys Ala Thr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ala Asp Thr Val Ile Glu Ala Asp Val Asp Glu Glu Pro Asp

| | | |
|---|-----|-----|
| 85 | 90 | 95 |
| Ala Glu Ile Ile Pro Val Arg Asp Phe Ala Ala Asp Val Thr Arg Ile | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Glu Gln Leu Thr Pro Thr Ile Lys Ser Ile Arg Leu Lys Leu Ser Gln | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Pro Ile Arg Phe Gln Ala Gly Gln Tyr Val Gln Leu Glu Ile Pro Gly | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Leu Gly Gln Ser Arg Ala Phe Ser Ile Ala Asn Ala Pro Ala Asp Val | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Ala Ala Thr Gly Glu Ile Glu Leu Asn Val Arg Gln Val Pro Gly Gly | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Leu Gly Thr Gly Tyr Leu His Glu Gln Leu Ala Thr Gly Glu Arg Val | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Arg Leu Ser Gly Pro Tyr Gly Arg Phe Phe Val Arg Arg Ser Ala Ala | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Arg Pro Met Ile Phe Met Ala Gly Gly Ser Gly Leu Ser Ser Pro Arg | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Ser Met Ile Ala Asp Leu Leu Ala Ser Gly Val Thr Ala Pro Ile Thr | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Leu Val Tyr Gly Gln Arg Ser Ala Gln Glu Leu Tyr Tyr His Asp Glu | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Phe Arg Ala Leu Ala Glu Arg His Pro Asn Phe Thr Tyr Val Pro Ala | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Leu Ser Glu Gly Ala Pro His Ala Gly Gly Asp Val Ala Gln Gly Phe | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Val His Asp Val Ala Lys Ala His Phe Gly Gly Asp Phe Ser Gly His | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Gln Ala Tyr Leu Cys Gly Pro Pro Ala Met Ile Asp Ala Cys Ile Thr | | |
| 305 | 310 | 315 |
| 320 | | |

Thr Leu Met Gln Gly Arg Leu Phe Glu Arg Asp Ile Tyr His Glu Lys

325

330

335

Phe Ile Ser Ala Ala Asp Ala Gln Gln Thr Arg Ser Pro Leu Phe Arg

340

345

350

【0102】

配列番号：8

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：T o m Q ポリペプチド

配列：

Met Asp Ala Gly Arg Val Cys Gly Thr Val Thr Ile Ala Gln Thr Asp

5

10

15

Glu Arg Tyr Ala Cys Val Ser Gly Glu Ser Leu Leu Ala Gly Met Ala

20

25

30

Lys Leu Gly Arg Arg Gly Ile Pro Val Gly Cys Leu Asn Gly Gly Cys

35

40

45

Gly Val Cys Lys Val Arg Val Leu Arg Gly Ala Val Arg Lys Leu Gly

50

55

60

Pro Ile Ser Arg Ala His Val Ser Ala Glu Glu Glu Asn Asp Gly Tyr

65

70

75

80

Ala Leu Ala Cys Arg Val Val Pro Asp Gly Asp Val Glu Leu Glu Val

85

90

95

Ala Gly Arg Leu Arg Lys Pro Phe Phe Cys Gly Met Ala Cys Ala Gly

100

105

110

Thr Ala Ala Ile Asn Lys

115

【0103】

配列番号：9

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：PCR用プライマー

配列：

AGTCCGCCAT GGAGGCGACA CCGATCATGA ATCAGC 36

【0104】

配列番号：10

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：PCR用プライマー

配列：

CACCGACCAT GGATCAGCAC CCCACCGATC TTTC 34

【0105】

配列番号：11

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：PCR用プライマー

配列：

TGCCGCCCTTC CATGGGTTCT GCCGCGAACCA GCAG 34

【0106】

配列番号：12

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：PCR用プライマー

配列：

AGCAAGCCAT GGCCATCGAG CTGAAGACAG TCGACATCA 39

【0107】

配列番号：13

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：PCR用プライマー

配列：

CCGACCATCA CCTGCTCGGC CAGATGGAAG TCGAG 35

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.8KbのDNA断片の制限酵素地図を示す。

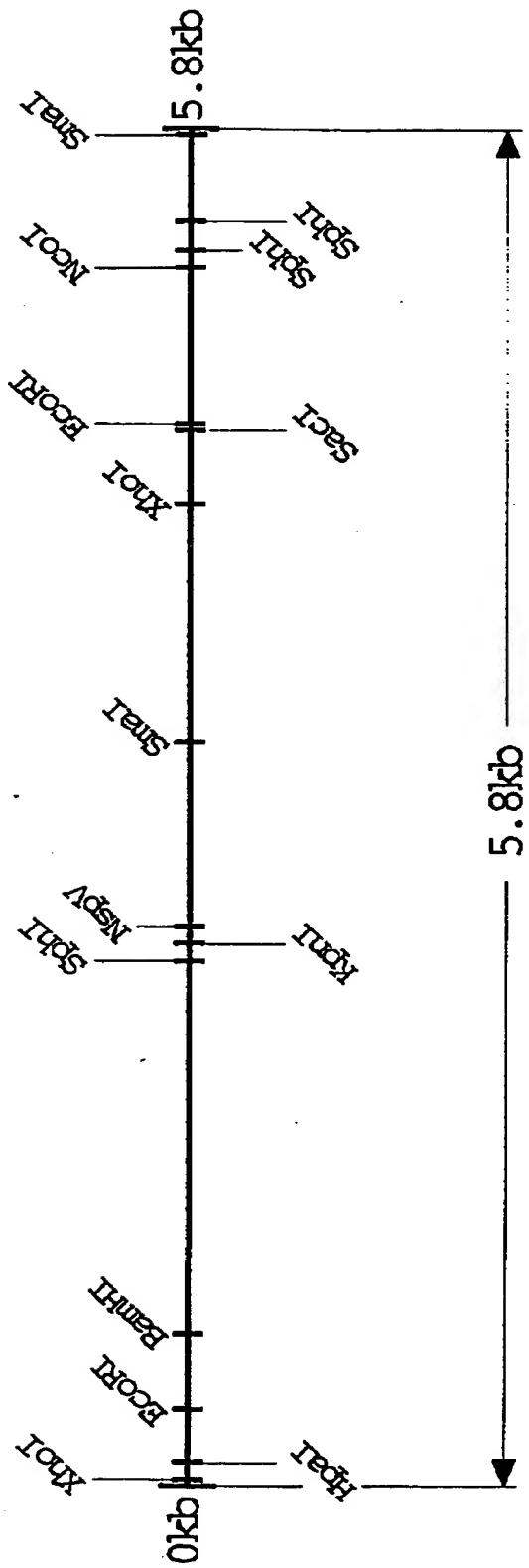
【図2】

実施例3における気相中のTCE量の経時的変化を示す図である。

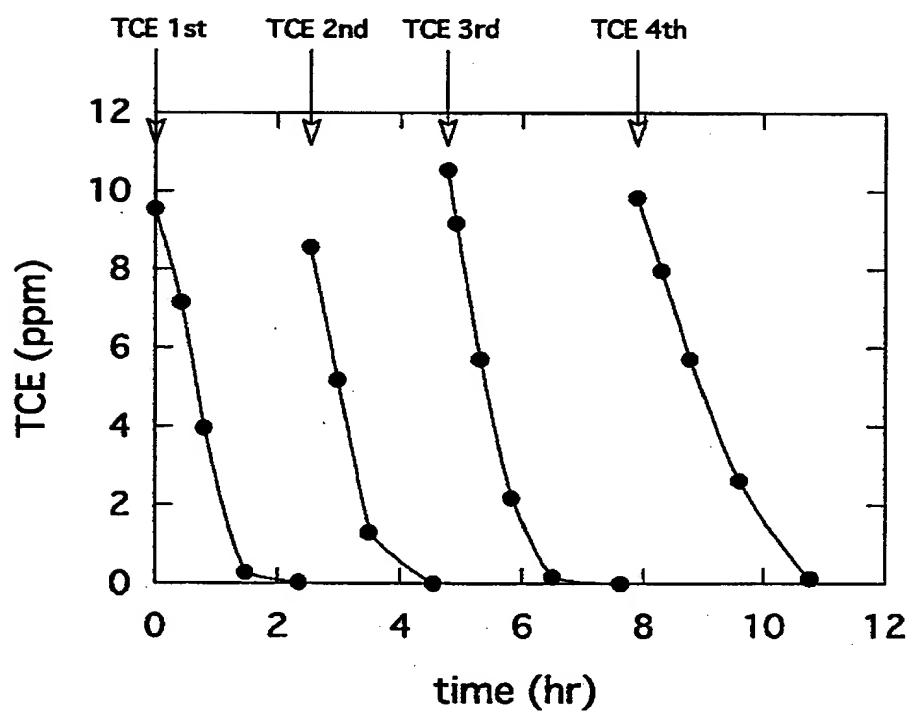
【書類名】 図面

【図1】

制限酵素地図



【図2】

pKK01組み換え大腸菌 (JM109) でのTCE分解
(計4回のTCE投与)

↓で示した時点で10ppm TCEを追加

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 挥発性有機塩素化合物あるいは芳香族化合物を含む排水や廃液等の水性媒体の浄化、それによって汚染された土壤の修復、および揮発性有機塩素化合物によって汚染された空気（気相）の浄化に有用なトルエンモノオキシゲナーゼを発現する形質転換体を提供すること。

【解決手段】 バルクホルデリア・セパシア KK01 株から単離されたトルエンモノオキシゲナーゼ遺伝子を用いて組換えDNAを調製し、これによって形質転換した形質転換体を揮発性有機塩素化合物あるいは芳香族化合物で汚染された水、排水、廃液、空気等の浄化に利用する。

【選択図】 図 1

【書類名】 職權訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000001007
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
 【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】 申請人
 【識別番号】 100070219
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
 【氏名又は名称】 8階 若林国際特許事務所
 若林 忠

【選任した代理人】

【識別番号】 100100893
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
 【氏名又は名称】 8階
 渡辺 勝

【選任した代理人】

【識別番号】 100088328
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
 【氏名又は名称】 8階
 金田 輝之

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
 【氏名又は名称】 8階
 石橋 政幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
 【氏名又は名称】 8階 若林国際特許事務所
 伊藤 克博

出願人履歴情報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名 キヤノン株式会社